



Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Odontologia
Mestrado em Odontologia

GARDÊNIA MATOS PARAGUASSU

**EFEITOS DAS FOTOTERAPIAS LASER ($\lambda 660\text{nm}$) E
LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) NO REPARO TECIDUAL EM
RATOS HIPOTIREOIDIANOS: ESTUDO
HISTOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO**



Salvador
2012

GARDÊNIA MATOS PARAGUASSU

**EFEITOS DAS FOTOTERAPIAS LASER ($\lambda 660\text{nm}$) E LED
($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) NO REPARO TECIDUAL EM RATOS
HIPOTIREOIDIANOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós - graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Luciana Maria Pedreira Ramalho

Co-orientadores (as): Prof^a Dr^a Tânia Tavares Rodriguez

Salvador
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

C871 Paraguassú, Gardênia Matos
Efeitos das fototerapias Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED
($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) no reparo tecidual em ratos hipotireoidianos:
Estudo Histológico e Imuno-histoquímico / Gardênia Matos
Paraguassú. – Salvador, 2012.
103 f.

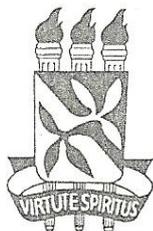
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Luciana Maria Pedreira Ramalho

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Tânia Tavares Rodriguez

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Odontologia, 2012.

1. Hipotireoidismo. 2. Endocrinologia. 3. Laser. 4.
Cicatrização de feridas. I. Ramalho, Luciana Maria Pedreira. II.
Rodriguez, Tânia Tavares. III. Universidade Federal da Bahia.
IV. Título.

CDU: 616.441



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. GARDÊNIA MATOS PARAGUASSÚ

“AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS
EFEITOS DAS FOTOTERAPIAS LASER(λ 660nm) E LED(λ 630nm) NO
REPARO TECIDUAL DE RATOS HIPOTIREOIDIANOS”,

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Orientador)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dra. Flávia Calo de Aquino Xavier (Examinador Interno)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dra. Maira Doria Martinez da Costa Lino - (Examinador Externo)
Doutora em Odontologia – Área de Concentração em Laser em Odontologia

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha **MÃE Moacira Matos**, a maior incentivadora da busca pelo conhecimento, por todo o carinho, compreensão e por toda a ajuda oferecida para a conquista de mais uma etapa; e aos meus orientadores, por permitirem que a ciência fizesse parte de minha vida e participarem da minha formação pessoal e profissional.*

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto, é realidade”
Raul Seixas*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, pela dádiva da vida, por me alicerçar e fornecer sabedoria para lidar com as escolhas e as dificuldades.

A minha mãe, **Moacira Matos**, meu maior tesouro! Obrigada pela dedicação, carinho, apoio, compreensão e confiança ao longo de todos esses anos. Sem você, eu não teria realizado este grande sonho.

A **Profª Drª Luciana Ramalho**, por toda a confiança e credibilidade depositadas, pela disponibilidade e por abrir ainda mais as portas da ciência. Obrigada por vibrar verdadeiramente pelo meu crescimento e pelas vitórias até então alcançadas, e principalmente pelo grande incentivo. A sua alegria contagiante e a simplicidade para enfrentar os obstáculos me incentivam cada dia mais!

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Pinheiro, grande referência de determinação, organização e dedicação! Obrigada pela oportunidade de ter feito parte da família do Centro de Biofotônica, pela inserção na pesquisa e pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos, sem os quais eu não conseguiria concluir este trabalho. O senhor também faz parte dessa conquista !!!!

A **Profª Drª Viviane Sarmiento**, por estar sempre ao meu lado torcendo e por ter contribuído com a base de minha formação científica desde a graduação. Agradeço pelo imenso carinho, acolhimento, amizade e orientação oferecidos ao longo de todos esses anos. Obrigada por cada palavra e cada incentivo para enfrentar os obstáculos, encarando-os como apenas mais um a ser superado. Obrigada por tudo!

A **Profª Drª Maria José Ramalho**, pela oportunidade de fazer parte de grupo de neuro-imuno-endocrinologia do ISC/UFBA, pelo apoio e carinho, estando sempre de braços abertos para contornar as dúvidas e anseios.

A **Profª Drª Tânia Rodriguez**, agradeço por todo apoio técnico científico, por enfrentar os diversos obstáculos com os quais nos deparamos, bem como pela enorme contribuição ao longo de todo este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas** pela recepção e oportunidade de realizar as reações de imuno-histoquímica no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, disponibilizando todos os recursos necessários.

A **Profª Drª Flávia Xavier**, obrigada pela dedicação, colaboração e confiança. Sua serenidade e paciência foram imprescindíveis em todos os momentos. Obrigada por todo apoio oferecido!

À **Profª Drª Maria Cristina Cangussu**, a quem dedico todo o mérito da análise estatística, obrigada pela disponibilidade e grande carinho.

Às bolsistas de Iniciação Científica, **Milena Goes, Naiadja Cerqueira, Amanda Campos, Grazielle Beanes, Viviane Cruz e Natália Moraes** agradeço pela dedicação, abraçando a pesquisa com responsabilidade e carinho. Vocês foram fundamentais!

Aos amigos **Jorge Pinto Filho, Poliana Pimentel, Isabelle DeCastro e João Reis Júnior**, agradeço pelo companheirismo desde a graduação, por compartilhar momentos de alegria e dificuldade, principalmente ao longo desta jornada, estando sempre disponíveis a ajudar.

À toda equipe do Centro de Biofotônica, em especial aos amigos **Artur Barbosa, Cristiane Becher, Fabíola Barbosa, Guilherme Pinheiro, Joubert Aciole, Máira Lino, José Augusto Cardoso, Ana Paula Cavalcanti e Carol Montaigne** pela amizade, apoio científico e colaboração.

Aos amigos do mestrado **Alex Morelli, Almiro Vasconcelos, Antônio Cândia, Isaac Queiroz, Paula Bonfim e Rodrigo Bonfim**, pelo apoio e a parceria, que foram essenciais nessa jornada. Obrigada por terem feito destes 2 anos inesquecíveis!

Aos professores da graduação e do mestrado, agradeço pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos transmitidos.

À **Dona Lurdes** pela valiosa colaboração e à **Srtª. Sueli Paixão**, pela paciência e pelo carinho.

À **Fapesb e ao CNPq** pelo apoio fundamental que oferecem à pesquisa e pela concessão da Bolsa e financiamento da pesquisa.

Ao **Instituto de Ciências da Saúde da UFBA**, ao **Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP** e toda sua equipe, pelo apoio técnico-científico e colaboração.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), minha eterna casa, muito obrigada por proporcionar todo o alicerce da minha formação pessoal e profissional. Tenho orgulho de fazer parte dessa família!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 REPARO TECIDUAL	21
2.2 FIOLOGIA DA GLÂNDULA TIREÓIDE E HORMÔNIOS TIREOIDIANOS	24
2.3 HIPOTIREOIDISMO	26
2.3.1 HIPOTIREOIDISMO E EFEITOS SOBRE A CICATRIZAÇÃO	28
2.4 FOTOTERAPIAS	29
2.4.1 LASER	33
2.4.2 LED	36
3 PROPOSIÇÃO	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA	42
4.2 AMOSTRA	42
4.2.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	42
4.3 INDUÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO	43
4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL	44
4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	44
4.6 IRRADIAÇÃO COM LASER E LED	46
4.7 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	48
4.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	48
4.9 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	50
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
5.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E PONDERAL	53
5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS	54
5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	67
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO A	97
ANEXO B	98

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Distribuição dos ratos nos grupos experimentais de acordo com a sua condição sistêmica, protocolo de irradiação e período experimental (UFBA, 2012).	43
Quadro 2	Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação (UFBA, 2012).	47
Quadro 3	Critérios utilizados na análise histológica (UFBA, 2012).	49
Quadro 4	Especificidade dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas (UFBA, 2012).	51
Quadro 5	Critérios utilizados na análise imuno-histoquímica (UFBA, 2012).	51
Tabela 1	Evolução do peso corporal médio (g), desvio padrão e percentual de crescimento (%) do peso corporal dos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos avaliados no pós-operatório de 7 e 14 dias (UFBA, 2012).	53
Tabela 2	Resultados da análise histológica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).	98
Tabela 3	Resultados da análise histológica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).	99
Tabela 4	Resultados da análise histológica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).	100
Tabela 5	Resultados da análise histológica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).	101
Tabela 6	Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).	102
Tabela 7	Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).	102
Tabela 8	Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).	103
Tabela 9	Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coleta da amostra de sangue através da punção da veia jugular (UFBA, 2012).	45
Figura 2	Instrumental utilizado para a confecção da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).	45
Figura 3	Delimitação dos pontos correspondentes ao ângulo da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).	45
Figura 4	Confecção da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).	45
Figura 5	Aspecto da ferida cirúrgica imediatamente após a sua confecção (UFBA, 2012).	45
Figura 6	Irradiação da ferida cirúrgica com a luz Laser de emissão vermelha (UFBA, 2012).	47
Figura 7	Irradiação da ferida cirúrgica com a luz LED de emissão vermelha (UFBA, 2012).	47
Figura 8	Representação gráfica da variação do peso corporal médio dos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos ao longo do experimento (UFBA, 2012).	54
Figura 9	Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico de intensidade moderada (HE, 100X). (UFBA, 2012).	59
Figura 10	Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição moderada e distribuição regular das fibras colágenas. (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).	59
Figura 11	Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).	59
Figura 12	Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).	59
Figura 13	Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório agudo discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).	59
Figura 14	Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).	59
Figura 21	Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à	55

reepitelização (UFBA, 2012).

Figura 22	Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à reepitelização (UFBA, 2012).	55
Figura 23	Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à reepitelização (UFBA, 2012).	56
Figura 24	Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).	56
Figura 25	Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à distribuição das fibras colágenas (UFBA, 2012).	58
Figura 15	Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização incompleta e infiltrado inflamatório crônico intenso (HE, 100X) (UFBA, 2012).	60
Figura 16	Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno moderada e distribuição irregular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).	60
Figura 17	Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico moderado (HE, 100X) (UFBA, 2012).	60
Figura 18	Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias deposição de colágeno moderada e distribuição regular (Picrosirius, 200X) (UFBA, 2012).	60
Figura 19	Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico moderado (HE, 200X) (UFBA, 2012).	60
Figura 20	Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno moderada e distribuição regular (Picrosirius, 200X) (UFBA, 2012).	60
Figura 38	Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à quantidade de tecido de granulação (UFBA, 2012).	62
Figura 39	Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à angiogênese (UFBA, 2012).	62
Figura 40	Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à	63

angiogênese (UFBA, 2012).

- Figura 41 Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED 64
avaliados no período experimental de 14 dias em relação à
proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).
- Figura 42 Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos 64
Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias
em relação à proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).
- Figura 26 Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias 65
mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico
de intensidade discreta (HE, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 27 Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias 65
mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular
(Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 28 Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias 65
mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório ausente
(HE, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 29 Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias 65
mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular
(Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 30 Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando 65
reepitelização completa e infiltrado inflamatório ausente (HE, 100X)
(UFBA, 2012).
- Figura 31 Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando 65
deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius,
100X) (UFBA, 2012).
- Figura 32 Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias 66
mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico
discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 33 Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias 66
mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular
(Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 34 Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias 66
mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico
discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 35 Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias 66
mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular
(Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).
- Figura 36 Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias 66
mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico

discreto (HE, 200X) (UFBA, 2012).

Figura 37	Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 200X) (UFBA, 2012).	66
Figura 55	Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunoexpressão do colágeno I e colágeno III (UFBA, 2012).	68
Figura 56	Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunoexpressão do colágeno I (UFBA, 2012).	69
Figura 57	Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunoexpressão do colágeno I e colágeno III (UFBA, 2012).	69
Figura 58	Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunoexpressão do colágeno III (UFBA, 2012).	70
Figura 43	Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 44	Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 45	Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 46	Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 47	Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 48	Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 49	Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 50	Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).	71
Figura 51	Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando	71

imunoexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

- Figura 52 Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão m de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 71
- Figura 53 Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 71
- Figura 54 Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 71
- Figura 59 Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 60 Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 61 Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 62 Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 63 Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 64 Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno I (200X) (UFBA, 2012). 74
- Figura 65 Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 75
- Figura 66 Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 75
- Figura 67 Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 75
- Figura 68 Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012). 75
- Figura 69 Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 75

2012).

- Figura 70 Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias 75 mostrando imunoexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).
- Figura 71 Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED 76 avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoexpressão do colágeno I (UFBA, 2012).
- Figura 72 Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED 77 avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoexpressão do colágeno III (UFBA, 2012).
- Figura 73 Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e 78 LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoexpressão do colágeno I (UFBA, 2012).
- Figura 74 Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e 78 LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoexpressão do colágeno III (UFBA, 2012).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFBA	-	Universidade Federal da Bahia
FOUFBA	-	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
BA	-	Bahia
ICS	-	Instituto de Ciência da Saúde
CEEA	-	Comissão de Ética na Experimentação Animal
T ₃	-	Triiodotironina
T ₄	-	Tiroxina
PTU	-	Propiltiouracil
TRH	-	Hormônio liberador da tireotropina
TSH	-	Hormônio tireoestimulante
EC	-	Grupo Eutireoidiano Controle
EL	-	Grupo Eutireoidiano irradiado com Laser
ED	-	Grupo Eutireoidiano irradiado com LED
HC	-	Grupo Hipotireoidiano Controle
HL	-	Grupo Hipotireoidiano irradiado com Laser
HD	-	Grupo Hipotireoidiano irradiado com LED
ADP	-	Adenosina difosfato
ATP	-	Adenosina trifosfato
nm	-	Nanômetro
µm	-	Micrometro
mm	-	Milímetro
cm	-	Centímetro
cm ²	-	Centímetro quadrado
mL	-	Mililitro
°C	-	Grau Celsius
mg	-	Miligrama
g	-	Gramma
Kg	-	Quilograma
Laser	-	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LED	-	<i>Light Emitting-Diode</i> (Diodo emissor de luz)
GaAIAs	-	Arseneto de gálio e alumínio
InGaAIP	-	Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio

CW	-	Emissão Contínua <i>Continuous Wave</i>
λ	-	Comprimento de onda
W	-	Watts
mW	-	Miliwatt
W/cm ²	-	Watts por centímetro quadrado
J	-	Joule
J/cm ²	-	Joule por centímetro quadrado
et al.	-	E colaboradores
s	-	Segundo(s)
HE	-	Hematoxilina-Eosina
p	-	Probabilidade de erro ou variabilidade amostral
%	-	Porcentagem
®	-	Marca registrada
RNA	-	Ácido ribonucléico
FAMED	-	Faculdade de Medicina
ICS	-	Instituto de Ciências da Saúde
USP	-	Universidade de São Paulo
LPM	-	Laboratório de Patologia Molecular
PBS	-	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
BSA	-	<i>Bovine Serum albumine</i> (Albumina de soro bovino)
DAB	-	3,3'-Diaminobenzidina
pH	-	Potencial de Hidrogênio Iônico
SAEF	-	<i>Spatial Average Energy Influence</i> (Densidade de energia média espacial)

RESUMO

A deficiência de hormônio tireoidiano tem sido associada a distúrbios no metabolismo corporal, incluindo o processo de cicatrização de feridas. Alternativas terapêuticas como as fototerapias Laser e LED têm evidenciado resultados positivos no reparo tecidual, mas a sua associação a distúrbios metabólicos como o hipotireoidismo não tem sido observada na literatura. Este estudo avaliou, através da análise histológica e imuno-histoquímica, a influência das fototerapias Laser e LED no processo de cicatrização de feridas excisionais em ratos hipotireoidianos e eutireoidianos. Para tanto, 72 ratos *Wistar albinus* machos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (Eutireoidiano e Hipotireoidiano) com 36 animais cada, e estes subdivididos em 3 subgrupos: Grupos controles Eutireoidiano (EC) e Hipotireoidiano (HC), nos quais não foi realizado nenhum tipo de tratamento; Grupos Laser Eutireoidiano (EL) e Hipotireoidiano (HL), irradiados com luz Laser (GaAIs, $\lambda 660\text{nm}$, 40mW, CW, $0,04\text{cm}^2$, $24\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, *Twin Flex Evolution*®, MMoptics) e Grupos LED Eutireoidiano (ED) e Hipotireoidiano (HD), cujas feridas foram irradiadas com luz LED (InGaAlP, $\lambda 630\pm 20\text{nm}$, 150mW, CW, $0,5\text{cm}^2$, $24\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, *FisioLED*®, MMoptics). Feridas cirúrgicas padronizadas (1cm^2) foram confeccionadas no dorso dos animais e submetidas à irradiação imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo repetidas a cada 48 horas, até a morte dos animais (sete e 14 dias). Os espécimes foram processados usando as técnicas de coloração HE e Picrosírius, e técnica imuno-histoquímica para avaliação de colágeno I e III, e avaliados por microscópica óptica. Os dados foram estatisticamente analisados. Os resultados demonstraram que nos grupos não irradiados, o hipotireoidismo dificultou a repavimentação epitelial (Exato de Fisher, $p < 0,05$). Os grupos irradiados com Laser ou LED apresentaram melhores resultados quando comparados aos grupos não irradiados, sendo as variáveis reepitelização, proliferação fibroblástica, distribuição colagênica e imunoexpressão dos colágenos tipo I e III, as que mostraram diferenças estatísticas mais marcantes (Exato de Fisher, $p < 0,05$). De modo geral, dentro dos parâmetros utilizados, as fototerapias Laser e LED foram capazes de melhorar o processo cicatricial, nestes animais.

PALAVRAS CHAVE: Hipotireoidismo, Cicatrização de feridas, Laser, LED.

ABSTRACT

Thyroid hormone deficiency has been associated with disturbances in body metabolism, including the process of wound healing. Alternative therapies such as Laser and LED phototherapies have shown positive results on tissue repair, but their association with metabolic disorders such as hypothyroidism has not been observed in the literature. The aim of this study was to assess, through histological and immunohistochemical analysis, the influence of Laser and LED phototherapies on excisional wound healing of euthyroid and hypothyroid rats. For this, 72 male *Wistar Albinus* rats were randomly distributed into two groups (euthyroid and hypothyroid) of 36 animals each and then divided into three subgroups: Control group: euthyroid control (EC) and hypothyroid control (HC), which was not performed any treatment; Laser group: euthyroid Laser (EL) and hypothyroid Laser (HL), both irradiated with Laser light (GaAlAs, $\lambda 660\text{nm}$, 40mW, CW, 0.04 cm^2 , $24\text{J}/\text{cm}^2$ per session, *Twin Flex Evolution*®, MMoptics) and LED group: euthyroid LED (ED) and hypothyroid LED (HD) both irradiated with LED light (InGaAlP, $\lambda 630\text{ nm}$, 150mW, CW, 0.5cm^2 , $24\text{J}/\text{cm}^2$ per session, *FisioLED*®, MMoptics). A standardized excisional wound was created in the mid-dorsal region of each rat (1cm^2). Rats were irradiated after surgery and every each 48h following sacrifice at 7 and 14 days. The specimens were processed to wax and stained with HE and Sirius Red as well as immunohistochemistry for the evaluation of collagen I and III, and then analyzed by optical microscopy. The data were statistically analyzed. The results demonstrated that in non-irradiated groups, hypothyroidism interferes on the epithelium pavementation (Fisher's Exact, $p < 0.05$). The groups irradiated with Laser or LED showed better results when compared to non-irradiated groups. Variables such as re-epithelialization, fibroblast proliferation, collagen distribution and immunostaining of collagen type I and III demonstrated the most remarkable statistical differences (Fisher's Exact, $p < 0.05$). In general, within the parameters used, the laser and LED phototherapy were able to improve the wound healing process in these animals.

KEY WORDS: Hypothyroidism, Tissue Repair, Laser, LED

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo fisiológico eficaz e complexo, caracterizado por uma grande variedade de eventos celulares e moleculares que interagem entre si, no intuito de iniciar o reparo de feridas logo após a lesão do tecido (ZIMMERMANN et al, 2003). Fatores exógenos e endógenos podem retardar os mecanismos de reparo (AL-WATBAN, 2009) ou alterar a integridade do tecido, aumentando a vulnerabilidade a condições patológicas como infecções. Por estes motivos, é fundamental o processo completo e eficiente da cicatrização da ferida para garantir o bem-estar geral dos pacientes (BAUM; ARPEY, 2005).

Distúrbios sistêmicos, tais como o hipotireoidismo, também podem complicar o processo de reparação tecidual (BIONDO-SIMÕES et al, 2005a; BIONDO-SIMÕES et al, 2005b). Os hormônios tireoidianos desempenham papel chave no controle do mecanismo energético do organismo, com participação marcante no processo de reparo de feridas, controlando a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos (SAFER; CRAWFORD; HOLICK, 2004), além de poderem modular a expressão do gen para o colágeno I (LEE et al, 1998). Dessa forma, a supressão da secreção destes hormônios causa distúrbios na ativação metabólica dos tecidos e na síntese do colágeno que vão desde a fase inflamatória até a fase proliferativa do reparo (NATORI et al, 1999). Nesse contexto, o retardo no processo de cicatrização de feridas associado ao hipotireoidismo pode, então, causar complicações para a recuperação de doentes crônicos (BIONDO-SIMÕES et al, 2005; NATORI et al, 1999), como o retardo cronológico da cicatrização, aumentando o risco de infecção da ferida (EKMEKTZOGLOU; ZOGRAFOS, 2004).

A necessidade de assistência para a população que apresenta feridas crônicas é um desafio crescente que requer abordagens inovadoras. As fototerapias Laser e LED são alternativas que podem ser utilizadas na biomodulação de processos fisiopatológicos envolvidos na cicatrização de feridas. Essas modalidades terapêuticas melhoram o processo natural de reparação tecidual, poupando tempo e recursos dos pacientes e serviços de saúde, além de reduzir o risco de infecção, diminuir a quantidade e custos dos curativos, bem como possibilitar o retorno dos pacientes às suas atividades de forma mais rápida (WHELAN et al, 2001).

Estudos sobre a fotobiomodulação na reparação tecidual têm sido desenvolvidos nas últimas décadas para verificar os efeitos positivos dessas fontes

de luz, sendo o Laser de baixa potência a fonte mais pesquisada e mais utilizada. Por outro lado, o LED possui restrita base literária, na qual são questionados os efeitos positivos e similares ao Laser. Entretanto, nem sempre os resultados apresentados nos estudos são satisfatórios ou estatisticamente significantes (DAMANTE et al, 2004; MELO et al, 2011; PUGLIESE et al, 2003).

Sabe-se que a luz oferece efeitos benéficos ao processo de cicatrização, o que é de grande relevância no tratamento de feridas cutâneas crônicas, nas quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias, bem como a melhora da nutrição celular e da qualidade do tecido neoformado (MEDRADO et al, 2008; MELO et al, 2011). O aumento na produção de fibroblastos e fibras colágenas, a estimulação da diferenciação miofibroblástica nas fases iniciais da cicatrização e o aumento da circulação sanguínea, também são efeitos, já reconhecidos, da fotobiomodulação (MELO et al, 2011; RIBEIRO et al, 2009).

Na literatura, são poucos os estudos relacionando o hipotireoidismo com o reparo tecidual, principalmente quando associado ao uso de fototerapias como as luzes Laser e LED. Porém, existem evidências comprobatórias da ação fotobiomodulatória destas fontes de luz no reparo tecidual de ratos normais ou com outras disfunções sistêmicas, como já verificadas em ratos diabéticos ou desnutridos (CARVALHO et al, 2006; PINHEIRO et al, 2006; PINHEIRO et al, 2005; RABELO et al, 2006; SANTOS et al, 2010). Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar, através de análise histológica e imuno-histoquímica, os efeitos das fototerapias Laser e LED no reparo tecidual em ratos hipotireoidianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPARO TECIDUAL

A reparação tecidual é um evento essencial e de alto gasto energético, que se inicia imediatamente após a lesão do tecido com o objetivo de restaurar sua função e integridade anatômica (CORAZZA, 2005; RAITZ, 2008; VINCK et al, 2003). A velocidade e a qualidade da cicatrização são reguladas pela quantidade de adenosina trifosfato (ATP) produzida, fundamental para fornecer a energia metabólica necessária para restaurar as propriedades da membrana celular, através da entrada e saída de sódio e potássio, além de construir e sintetizar novas proteínas (STARKEY, 2001).

O processo de cicatrização envolve a integração de eventos dinâmicos, incluindo a liberação de citocinas e fatores de crescimento, coagulação, participação de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos), neovascularização, reepitelização e contração tecidual, proliferação de fibroblastos, bem como a síntese de fibras colágenas e formação de matriz extracelular, que culminam na remodelação do tecido (RAITZ, 2008; WHELAN et al, 2001; VINCK et al, 2003).

A seqüência desses eventos envolvem 3 fases, representadas pela inflamação, proliferação (formação de tecido de granulação com depósito de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos) e remodelação tecidual (BAUM; ARPEY, 2005; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; RAITZ, 2008; WHELAN et al, 2001; VINCK et al, 2003; ZIMMERMANN et al, 2003). Entretanto, a exata duração de cada fase não tem como ser diferenciada, pois estas estão sobrepostas entre si e há variabilidade de um caso para outro (BAUM; ARPEY, 2005; ZCHARIA et al, 2005).

A primeira fase caracteriza-se pela hemostasia, resultante da formação do coágulo de fibrina, e migração de leucócitos fagocitários, os quais removerão as substâncias estranhas e microorganismos (ISAAC et al, 2010). A resposta inflamatória ocorre do primeiro até o terceiro dia após a injúria do tecido e as células envolvidas durante este período consistem, principalmente, em células inflamatórias (NATORI et al, 1999). Trata-se da reação de defesa no tecido conjuntivo vascularizado, frente a uma agressão, e seu papel não se restringe apenas a combater o agente lesivo, pois também desencadeia uma série de reações que

promovem a reparação tecidual e restauração da função (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Todavia, a inflamação pode produzir efeitos indesejáveis, como dor, edema e perda de função local (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Durante a fase proliferativa, que ocorre a partir do terceiro dia até a segunda semana após a lesão tecidual, os fibroblastos do tecido de granulação são as principais células envolvidas (NATORI et al, 1999). Além de fibroblastos, o tecido de granulação contém macrófagos, colágeno imaturo, vasos sanguíneos e substância matricial. Os macrófagos permanecem ativos nesta fase, fagocitando e auxiliando na liberação de fatores de crescimento, juntamente com as plaquetas. Dessa forma, à medida que o tecido de granulação prolifera, os fibroblastos estimulam a produção de colágeno, que proporciona ao tecido sua força de tensão (CORAZZA, 2005), bem como de elastina, fibronectina, glicosaminoglicano e proteases, que participam do remodelamento fisiológico (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; RAITZ, 2008).

Os fibroblastos, com diferenciação miofibroblástica, acumulados nas margens da ferida, iniciam então o processo de contração tecidual, executando atividades contráteis que direcionam as bordas das feridas para o centro (ISAAC et al, 2010; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; RAITZ, 2008). Entretanto, isoladamente, a contração da ferida raramente é capaz de levar ao seu fechamento definitivo, dependendo também da formação do tecido de granulação e da reepitelização (FERREIRA et al, 2008; RAITZ, 2008).

Em seguida, ocorre a fase de remodelação, que se estende desde a segunda semana a vários meses. Embora as mudanças que ocorrem neste período continuem a se desenvolver, seu início se sobrepõe à produção de tecido de granulação durante a fase proliferativa da cicatrização. Durante a segunda semana, os fibroblastos e seus produtos, o colágeno e metaloproteinases da matriz, representam importantes elementos da ferida (BAUM; ARPEY, 2005). Por outro lado, as células inflamatórias e a quantidade de vasos sanguíneos diminuem consideravelmente (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As fibras colágenas são proteínas sintetizadas pelos fibroblastos desde a fase inflamatória até a proliferativa, e principalmente durante processo de maturação da ferida, constituindo-se o principal componente da matriz extracelular (NATORI et al, 1999; SETHI et al, 2002). Há diferentes tipos de colágeno, sendo os principais do tipo I, II, III, IV, VII, IX e XI. Os colágenos do tipo I, II e III são os mais abundantes e

formam fibrilas de estrutura similar (SETHI et al, 2002). O colágeno tipo I é o principal colágeno da pele, osso e tendão e o colágeno tipo III é geralmente observado na pele e vasos sanguíneos, produzindo parte da membrana basal do tecido lesionado. O colágeno tipo IV, também tem sido reconhecido como o principal componente da membrana basal, desempenhando papel no processo de adesão celular (NATORI et al, 1999; SETHI et al, 2002).

Durante a fase proliferativa, o colágeno tipo III está em maior quantidade em relação ao colágeno tipo I, entretanto, na fase de remodelação, as quantidades de colágeno ficam equilibradas. É nesta fase que ocorre a mudança no padrão de organização do colágeno e de seu tipo principal, ocorrendo substituição do colágeno III por colágeno I, que é o colágeno fibrilar maduro. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos. Desta forma, a ferida caracteriza-se pela maior proporção de colágeno III em relação ao tipo I, que é encontrado principalmente na derme íntegra (ISAAC et al, 2010).

O número de fibras colágenas aumenta rapidamente até, aproximadamente, a terceira semana e depois se estabiliza. À medida que ocorre a remodelagem da cicatriz, estas fibras se tornam mais organizadas e espessas, assumindo orientação paralela que fornece suporte ao tecido. Dessa forma, a qualidade e a quantidade total de fibras colágenas na matriz extracelular, bem como sua espessura e distribuição no processo de remodelação e maturação tecidual, são responsáveis por oferecer maior resistência à tensão cicatricial (ISAAC et al, 2010; NATORI et al, 1999; ZIMMERMANN et al, 2003).

Quanto à resistência da ferida, tem sido demonstrado que ao final da primeira semana ocorre apenas restauração de 3% da resistência da pele íntegra, na terceira semana, de 20 a 30%, e em torno de três meses, 80%. Isso reflete na redução da deposição de colágeno ao longo do tempo e na mudança do colágeno tipo III para o tipo I, que em cerca de um ano atinge proporção semelhante à fase anterior à lesão do tecido, entretanto, a ferida não atingirá 100% de sua resistência fisiológica (CORAZZA, 2005; ISAAC et al, 2010).

Os eventos supracitados são intrínsecos ao organismo e ocorrem espontaneamente durante o processo de reparação tecidual. Todavia, a complexidade da cicatrização da ferida a torna vulnerável à interrupção, quando

fatores que afetam as respostas fisiológicas e funções celulares estão presentes (BROUGHTON; JANIS; ATTING, 2006). Neste sentido, apesar de o padrão de cicatrização ser essencialmente o mesmo para diferentes ferimentos (BROUGHTON; JANIS; ATTING, 2006; PINHEIRO et al, 2009), uma série de condições locais e gerais pode influenciar este processo (PINHEIRO et al, 2009), agravando a lesão e prolongando os mecanismos de reparo (AL-WATBAN, 2009).

Fatores locais como vascularização inadequada, presença de trauma, microorganismos patogênicos e de corpos estranhos, podem influenciar fortemente o reparo tecidual (BROUGHTON; JANIS; ATTING, 2006; PINHEIRO et al, 2009) e prolongar o processo de cicatrização, levando à formação de feridas crônicas ou hipertróficas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; ISAAC et al, 2010). Outros fatores como a idade, gênero, deficiências nutricionais e hormonais, uso de drogas, e algumas doenças ou condições tais como diabetes não controlada (AL-WATBAN, 2009, PINHEIRO et al, 2009), desnutrição, anemia e hipotireoidismo também podem retardar a cicatrização (PINHEIRO et al, 2009).

2.2 FISIOLOGIA DA GLÂNDULA TIREÓIDE E HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A glândula tireóide, localizada abaixo da laringe, bilateral e anteriormente à traquéia, é fundamental para a produção de dois hormônios tireoidianos, a triiodotironina (T_3) e a tiroxina (T_4). A formação destes hormônios ocorre através da captação de íons iodetos pela bomba de iodeto, presente na membrana das células epiteliais desta glândula. Os íons iodetos são convertidos à forma oxidada de iodo, pela enzima peroxidase, combinando-se com o aminoácido tirosina da molécula de tireoglobulina, uma glicoproteína produzida e secretada pelas células epiteliais que revestem os folículos tireoidianos (GUYTON; HALL, 2006).

Os hormônios T_3 e T_4 são armazenados nos folículos tireoidianos, ligados à tireoglobulina, e posteriormente digeridos por enzimas lisossomais, conhecidas como proteinases, para em seguida serem liberados no sangue circulante. Os hormônios tireoidianos se incorporam a proteínas plasmáticas do sangue para que sejam lentamente liberados para os tecidos ou se liguem a proteínas intracelulares nas células funcionais (GUYTON; HALL, 2006).

O hormônio tireoidiano é produzido na forma de um precursor inativo, a tiroxina (T_4), da qual deriva, por desiodação nos tecidos periféricos, cerca de 80% da

triodotironina (T_3) circulante (FORTUNATO; ROSENTHAL; CARVALHO, 2007; NUNES, 2003). Ambos apresentam semelhante importância do ponto de vista funcional, mas o T_3 apresenta atividade biológica cerca de quatro vezes maior que a do T_4 . É dele que depende a atividade de, praticamente, todos os tecidos do organismo, sendo o responsável pela elevação da expressão e atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo, como ATPases, transportadores iônicos e proteínas importantes para o desenvolvimento de funções específicas destas enzimas (NUNES, 2003).

Os hormônios tireoideanos são fundamentais para a regulação do metabolismo energético (LAZAR, 2003), para o crescimento, desenvolvimento e diferenciação dos órgãos e tecidos (NUNES, 2003; LAZAR, 2003; GOMES et al, 2008). Por este motivo, estes hormônios são considerados essenciais para a manutenção da qualidade de vida (NUNES, 2003) e sua deficiência ocasiona inúmeras alterações, dentre as quais se destaca a disfunção adrenal, levando à baixa secreção de corticosterona (TOHEI, 2004), morbidade cardiovascular (MOOLMAN, 2002) e dificuldade no processo de reparo de feridas (NATORI et al, 1999).

As mitocôndrias são alvos estabelecidos para a ação dos hormônios tireoidianos, aumentando o número e a atividade dessas organelas, e, conseqüentemente, a velocidade de formação de ATP para obter energia e garantir a função celular. A regulação da biogênese e da atividade mitocondrial pelo hormônio tireoidiano é bem documentada em vários tecidos como pulmão, rim, coração e músculos. A administração de T_3 aumenta o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa nestes tecidos (MARTINEZ et al, 2009).

Para que a atividade metabólica do organismo seja mantida em níveis de normalidade, é necessário que o hormônio tireoidiano seja constantemente secretado na quantidade correta. A manutenção dos níveis normais dos hormônios tireoidianos é controlada por um sistema de retroalimentação negativa, mediado pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, através dos hormônios de liberação da tireotropina (TRH) e tireoestimulante (TSH) (GUYTON; HALL, 2006).

A secreção hipofisária de TSH regula a secreção de T_4 e T_3 que, por sua vez, exercem “feedback” negativo no controle de secreção dos hormônios da tireóide. O aumento da secreção dos hormônios tireoidianos promove, em nível de hipotálamo, a redução na secreção de TRH, provocando redução na secreção de TSH pela

adeno-hipófise e na secreção de T_3 e T_4 pela tireóide, diminuindo o metabolismo basal celular (LAZAR, 2003; MILHORANSA; SOAORES, 2009).

Além disso, para a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvos, os níveis intracelulares de T_3 dependem não apenas da atividade tireoidiana regulada por este eixo, mas também da geração intracelular deste hormônio, cuja disponibilidade é regulada pela atividade de enzimas específicas chamadas desidases (NUNES, 2003).

A desidase do T_4 faz parte do processo de homeostase do hormônio tireoidiano. As desidases regulam os níveis e a ação dos hormônios tireoidianos nos ambientes intra e extracelulares (HUANG; BIANCO, 2008), sendo estas, as principais fontes de T_3 circulante e intracelular. Tais enzimas apresentam papéis específicos em função de suas distintas características e formas de regulação. As desidases, especialmente as do tipo I, são enzimas sensíveis ao Propiltiouracil (PTU) e responsáveis por gerar nos tecidos periféricos, a partir do T_4 circulante, aproximadamente 75% do T_3 presente no soro. Já as desidases do tipo II geram T_3 principalmente para os tecidos nos quais são expressas (NUNES, 2003).

Sob condições normais, o TRH é liberado pelo hipotálamo, em resposta a estímulos externos e internos, e estimula a secreção de TSH pela hipófise anterior, que, por sua vez, estimula a liberação de T_3 e T_4 pela glândula tireóide (GUYTON; HALL, 2006). Contudo, a idade, o uso de drogas, alterações sistêmicas, além de disfunções da glândula tireóide e da hipófise, podem afetar a secreção de T_3 e T_4 para o sangue (BIONDO-SIMOES et al, 2005a; BIONDO-SIMOES et al, 2005b).

2.3 HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo é uma desordem que decorre da redução patológica dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, cuja prevalência varia entre 0,9% e 15,9% na população (PONTES et al, 2002). No entanto, dados mais recentes quanto à sua prevalência no Brasil não têm sido encontrados na literatura.

Esta disfunção pode resultar de alterações estruturais ou funcionais no eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano, que interferem na produção de níveis adequados dos hormônios tireoidianos no plasma, ou da disfunção dos hormônios

reguladores da secreção de T_3 e T_4 , ou seja, do TRH (hormônio liberador de tireotrofina) ou do TSH (hormônio tireotrófico) (BESENOR, 2002; NUNES, 2003).

A forma primária da disfunção é responsável pela grande maioria dos casos, e pode decorrer tanto da remoção cirúrgica da glândula tireóide, quanto por doença auto-imune, conhecida como tireoidite de Hashimoto, ou do uso de drogas antitireoidianas, como o metimazol e PTU. A forma secundária decorre da deficiência de TSH e a forma terciária de qualquer desordem no hipotálamo ou da deficiência do TRH, que impede a chegada deste hormônio na hipófise (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Os pacientes em estado de hipotireoidismo, geralmente apresentam atividade muscular lenta, fadiga, extrema sonolência, algumas vezes aumento do peso corporal, lentidão mental, redução do crescimento de pêlos, pele escamosa, além da redução do volume sanguíneo, da frequência cardíaca e do débito cardíaco (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996)

O PTU e outros compostos semelhantes, como metimazol e o carbimazol, têm sido utilizados no tratamento do hipertireoidismo. Estes agentes antitireoidianos impedem a formação do hormônio tireoideano a partir dos iodetos e da tirosina. O mecanismo deste efeito consiste, em parte, no bloqueio da atividade da enzima tireoperoxidase, responsável pela oxidação do iodeto para que este se combine com a tirosina, e do acoplamento de duas tirosinas iodetadas para formar o T_4 ou T_3 . (GUYTON; HALL, 2006; NUNES, 2003). Além disso, também atua na inibição da conversão de T_4 em T_3 nos tecidos extra-tireoideanos, resultando na deficiência destes hormônios no organismo e estabelecendo, assim, o quadro de hipotireoidismo (TOHEI, 2004).

Dessa forma, a supressão da produção de hormônios tireoideanos, através da administração do PTU, tem sido utilizada em modelos experimentais associados às disfunções da tireóide, e a alterações no metabolismo e desenvolvimento corporal, com a finalidade de induzir o hipotireoidismo (FERREIRA et al, 2007; GOMES et al, 2008; RODRIGUEZ; RAMALHO; DANTAS, 2009). A administração oral do PTU diluído em água (0,05g/100ml) por um período de 4 semanas é uma das formas encontradas na literatura para induzir o estado de hipotireoidismo em modelo animal (RODRIGUEZ; RAMALHO; DANTAS, 2009; RAMALHO et al., 2010).

2.3.1 HIPOTIREOIDISMO E EFEITOS SOBRE A CICATRIZAÇÃO

O aumento da qualidade de vida, associado ao acesso à saúde, tem caracterizado uma população cada vez mais idosa e susceptível a doenças cardiovasculares, neoplasias e distúrbios hormonais. Além disso, a desnutrição, deficiências vitamínicas, diabetes e alterações neuroendócrinas, como o hipotireoidismo, podem ser responsáveis por distúrbios na reparação tecidual (BIONDO-SIMÕES et al, 2005a; BIONDO-SIMÕES et al, 2005b).

Apesar de o estado de hipotireoidismo não se limitar apenas aos indivíduos idosos, é preocupante a realização de procedimentos cirúrgicos nos pacientes acometidos por esta disfunção, uma vez que este estado influencia a síntese protéica (BIONDO-SIMÕES et al, 2005b) e constitui um importante fator de atraso na cicatrização de feridas (NATORI et al, 1999; BIONDO-SIMÕES et al, 2005a; BIONDO-SIMÕES et al, 2005b). O favorecimento do reparo cicatricial é importante na redução da morbidade pós-cirúrgica de indivíduos hipotireoidianos, dos custos globais dos atendimentos ambulatoriais e hospitalares, bem como na antecipação do retorno dos indivíduos às suas atividades sociais e laborais.

O reparo tecidual é um fenômeno que ocorre após qualquer tipo de lesão tecidual, sendo, por isso, necessário conhecer os fatores que possam impedi-lo de ocorrer (PINHEIRO, 2009). Estudos experimentais têm demonstrado que o estado de hipotireoidismo está associado à redução da síntese e concentração de colágeno, e ao atraso do processo de reparo do tecido, que pode ser piorado com o envelhecimento, já que as mudanças fisiológicas com o aumento da idade resultam em dano à cicatrização (BIONDO-SIMÕES et al, 2005b; ZIMMERMAN et al, 2009).

Os efeitos da deficiência hormonal sobre a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas são os responsáveis pelas alterações metabólicas detectadas nas disfunções tireoidianas (NUNES, 2003). Além disso, como o hormônio tireoidiano, dentre outras ações, estimula a diferenciação e proliferação celular (SAFER; CRAWFORD; HOLICK, 2005; MEYER; WAGNER; MAIA, 2007), acredita-se que sua supressão provoca distúrbio na ativação metabólica nos tecidos e na síntese de colágeno, que se estende desde a fase inflamatória até a fase proliferativa, uma vez que estão associados com a proliferação e a secreção dos fibroblastos no processo de cicatrização de feridas (NATORI et al, 1999).

Zimmermann et al. (2003) investigaram a influência do hipotireoidismo sobre o processo cicatricial da traquéia de ratos e observaram o prolongamento da fase inflamatória, diminuição da quantidade de colágeno, bem como atraso na sua maturação e organização, quando comparado ao grupo controle. Alguns estudos têm demonstrado que o hormônio tireoidiano participa da modulação da expressão do gen para o colágeno I (YAO; EGHBALI, 1992), identificando os mecanismos moleculares envolvidos na indução do hormônio tireoidiano que regula o RNA mensageiro para o colágeno (LEE et al, 1998).

As estruturas bucais também estão sob controle endócrino da glândula tireóide, mas a influência dos hormônios tireoidianos sobre estes tecidos e no reparo tecidual ainda não está bem estabelecido na literatura. Douglas et al. (2006) avaliaram, em seu estudo, a influência da deficiência dos hormônios tireoideanos na mucosa gengival de ratos hipotireoidianos. Foi observado a redução do conteúdo de proteínas totais na mucosa gengival, em virtude da redução da síntese proteica, sem alteração do colágeno e da população celular.

A compreensão da relação entre os eventos clínicos, celulares e moleculares que ocorrem durante este processo, bem como os fatores que podem alterá-lo, são importantes para planejar futuras intervenções terapêuticas em casos de feridas com cicatrização anormal ou atrasada (BAUM; ARPEY, 2005).

As fototerapias Laser e os diodos emissores de luz (LEDs) destacam-se dentre as abordagens terapêuticas utilizadas para melhorar o processo de cicatrização, uma vez que são capazes de estimular a reparação tanto de tecido ósseo quanto de tecido mole (PINHEIRO, 2009). Devido à ação destas fontes de luz na modulação do processo inflamatório, proliferação fibroblástica, deposição e organização de fibras colágenas, os quais são afetados pela falta de hormônio tireoidiano, é de fundamental importância verificar os efeitos destas fototerapias em sistemas com comprometimento hormonal, no intuito de estabelecer protocolos de irradiação que auxiliem no reparo cicatricial de pacientes com hipotireoidismo clínico ou subclínico.

2.4 FOTOTERAPIAS

Diante de uma intervenção cirúrgica, pacientes e profissionais têm buscado, cada vez mais, não apenas o resultado final satisfatório, mas também um pós-

operatório confortável e livre de complicações (BORGGO, 2010). Para isso, soluções que visem melhorar a qualidade de vida dos pacientes que são acometidos por deficiência no processo de reparação tecidual estão sendo investigadas na literatura (DALL AGNOL et al, 2009).

Várias modalidades terapêuticas têm sido estudadas no intuito de buscar métodos mais adequados para melhorar e acelerar o processo cicatricial. No entanto, a possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento de lesões cutâneas, utilizando recursos fototerápicos, é objeto de estudo de inúmeros pesquisadores (CORAZZA et al, 2007; DALL AGNOL et al, 2009; FERREIRA et al, 2008; RIBEIRO et al, 2009), principalmente quando associado ao comprometimento sistêmico e a fatores como a cicatrização por segunda intenção, que dificultam ainda mais o reparo tecidual (RABELO et al, 2006; RAMALHO et al., 2010; SANTOS et al, 2010).

Nos últimos anos, a fototerapia por meio de luzes coerentes (Laser) e não coerentes (LED) (DESMEST et al, 2006; VINCK et al, 2003; WHELAN et al, 2001) tem sido considerada uma alternativa terapêutica segura e não invasiva, por não provocar efeitos colaterais (MEDRADO et al, 2003) e apresentar como vantagens efeitos anti-inflamatórios e estimuladores da cicatrização (RIBEIRO et al, 2009; WEISS et al, 2005). A fotobiomodulação leva ao aumento da vascularização, à proliferação fibroblástica, ao estímulo da deposição e organização de fibras colágenas, promovendo maior qualidade e rapidez no processo cicatricial, fato relevante quando se trata do hipotireoidismo.

A fotobiomodulação é mediada pela absorção da luz pelos citocromos, em especial o citocromo c oxidase, presentes na membrana mitocondrial (WEISS et al, 2005). A fototerapia ativa a cadeia respiratória por meio da absorção da luz por este fotorreceptor, aumentando a transferência de elétrons, a produção e o metabolismo oxidativo da mitocôndria, além de gerar espécies de oxigênio reativo, os quais funcionam como moléculas sinalizadoras que promovem a comunicação entre mitocôndria, citosol e núcleo (WHELAN et al, 2003). Os estímulos resultam no aumento da energia celular e ativação da síntese de ácidos nucléicos, essenciais no reparo de lesões (TUNÉR; HODE, 2002).

A luz absorvida através de citocromos na mitocôndria produz ATP, fornecendo energia que aumenta a atividade metabólica das células-alvo, o que acelera ou estimula a proliferação celular e a síntese de proteínas, tais como as

fibras colágenas, que são produzidas pelos fibroblastos. Deste modo, ao entrar em estado fotoativado, a célula procura restabelecer o estado de normalização da região afetada, favorecendo o processo de cicatrização (WEISS et al, 2005).

Na reparação tecidual, a fototerapia interage em cada uma das três fases, proporcionando respostas positivas em cada uma delas (SOMMMER et al, 2001). Na fase inflamatória ocorre a fotobiomodulação celular, ou seja, ao mesmo tempo em que se reduz o número de células inflamatórias, estimula-se sua funcionalidade para produzir fatores de crescimento (WHELAN et al, 2001), iniciando assim, a fase proliferativa (SOMMMER et al, 2001). Acredita-se que inicialmente ocorre aumento das células inflamatórias no local da lesão, no intuito de remover rapidamente o excesso de detritos celulares, reduzindo, conseqüentemente, o número das células inflamatórias e dinamizando a produção de fatores de crescimento (WHELAN et al, 2001).

Durante a fase de proliferação celular, a fotobiomodulação ainda promove a neoformação de vasos sanguíneos pela fotoestimulação das células endoteliais (SOMMMER et al, 2001), proliferação de fibroblastos (VINCK et al, 2003) e deposição de colágeno (CARVALHO et al, 2006), colaborando para a maior formação do tecido de granulação e para a efetiva contração da ferida. Já a última fase do processo de reparação contribui com a remodelação do tecido, que consiste na reorganização das fibras colágenas (CORAZZA, 2005).

O efeito fotobiomodulador depende ainda do estado fisiológico da célula no momento da irradiação, pois células com potencial redox reduzido, como em certas condições patológicas, tornam-se mais sensíveis à irradiação. Células em homeostasia reagem pouco ou não reagem à fototerapia e por isso o seu efeito nem sempre é detectável (MEYER et al, 2010; PINHEIRO, 2009).

As fototerapias Laser e LED têm se destacado como métodos bioestimuladores para o reparo tecidual na faixa espectral do vermelho ao infravermelho (630-1000nm), modulando numerosas funções celulares (DESMET et al, 2006; PINHEIRO et al, 2009; WHELAN et al, 2001; WHELAN et al, 2003), aumentando a circulação local, proliferação celular e síntese de colágeno (DESMET et al, 2006). No entanto, efeitos mais pronunciados têm sido observados, particularmente, no comprimento de onda vermelho (WHELAN et al, 2003, WHELAN et al, 2001; PINHEIRO et al, 2009).

A escolha de parâmetros apropriados no estabelecimento de protocolos da fototerapia é essencial para os resultados a serem alcançados com o tratamento (PINHEIRO, 2009). Vale ressaltar que o uso adequado do comprimento de onda, dentro da banda espectral de absorção pelas moléculas fotorreceptoras é também um fator importante a ser considerado (VINCK et al, 2003), pois define a profundidade de penetração no tecido alvo, sendo de 0,5 a 2 mm para a luz vermelha (635 – 670 nm) e de 2 a 4 mm para a luz infravermelha (820nm – 904nm). Comprimentos de onda na faixa do vermelho são indicados para estimular o processo de reparo de tecidos moles e promover efeito anti-inflamatório. Já os comprimentos de onda na faixa o infravermelho são mais utilizados sobre o processo de reparo de tecidos duros e no controle da dor (LOW; REED, 2001).

Doses mais elevadas não têm mostrado efeitos positivos no estímulo de tecidos vivos, podendo causar inibição ou reação exagerada, já as doses mais baixas são recomendadas quando a membrana de mucosas ou feridas são irradiadas, em virtude da ausência da pele que funcionaria como uma barreira óptica. Também se deve considerar a utilização do método de irradiação por contato na escolha das doses, pois caso a técnica sem contato seja utilizada haverá perda de energia por reflexão o que dificulta seu cálculo (PINHEIRO, 2009; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Quanto à escolha da dose e do intervalo de tempo utilizado, o estado do processo (agudo ou crônico) e o estado sistêmico do paciente devem ser levados em consideração. Além disso, a proliferação celular é mais intensa 24 horas após a irradiação e diminui, de forma dependente da energia, em até 72 horas (PINHEIRO, 2009).

Deste modo, vale ressaltar que a eficácia da fototerapia e a resposta do tecido à radiação não depende apenas do comprimento de onda, mas também de outros parâmetros que incluem a quantidade de energia fornecida para o tecido, o tempo de exposição, a frequência da aplicação, o método de entrega bem como a densidade de potência (PINHEIRO, 2009). Salienta-se, ainda, a necessidade de conhecimento da condição sistêmica para que a dose seja estabelecida e a aplicação seja efetiva, pois a super dosagem pode ser prejudicial ao tecido (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

2.4.1 LASER

A palavra Laser é o acrônimo para a expressão inglesa *Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) (WALSH, 2003; PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010), e se refere ao sistema de onda eletromagnética não ionizante, muito bem tolerada pelos tecidos, que permite a obtenção de feixe de luz altamente concentrado (SANDOVAL et al, 2003). Apresenta características distintas de outras fontes de luz, principalmente devido aos fenômenos físicos envolvidos na sua produção por emissão estimulada de radiação (PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010).

O Laser é composto basicamente pelo meio ativo, cavidade óptica e fonte de ativação. O tipo de Laser é determinado pelo comprimento de onda de emissão e pelo meio ativo característico utilizado para produzi-lo, sendo a família dos Lasers de diodo representados pelo GaAIAs (Arseneto de Gálio-Alumínio), AsGa (Arseneto de Gálio) e InGaAlP (fosfeto de índio, gálio e alumínio) (BORGGO, 2010).

A cavidade óptica é o espaço onde o meio ativo fica alojado e ocorre a amplificação da luz quando uma fonte energética fornece energia para um átomo do meio (PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010). No caso dos Lasers de diodo, que são os mais utilizados, o Laser é obtido adicionando-se superfícies refletoras em ambas as extremidades da união de semicondutores em um LED, estabelecendo-se com isso uma cavidade ressonante. Desta forma, é possível obter um feixe de luz monocromático e coerente (BORGGO, 2010).

A luz Laser possui características peculiares, como a monocromaticidade, coerência e colimação, que resultam do processo de emissão estimulada, já que os fótons emitidos possuem as mesmas características (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Tais propriedades são responsáveis por fornecer grande quantidade de energia concentrada em pequenos pontos e com alta precisão, além de diferenciar a luz Laser de outras fontes de luz (WALSH, 2003; BORGGO, 2010).

A monocromaticidade se deve ao fato de a luz Laser emitir radiações em um único comprimento de onda ou em um feixe que abrange faixa estreita do comprimento de onda considerado, o que promove diferentes tipos de interação para o tecido alvo, devido à absorção seletiva pelos cromóforos (CORAZZA, 2005; PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010; BORGGO, 2010). A coerência está intimamente relacionada com os mecanismos da emissão estimulada, permitindo

que o feixe de luz se propague na mesma direção no tempo e no espaço com a mesma frequência (CORAZZA, 2005). Já a colimação, está associada à unidirecionalidade da luz, que se propaga de forma paralela entre si e com divergência mínima, devido à alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos, evitando que o feixe perca intensidade conforme se propaga no espaço (PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010).

Dentre as características inerentes ao Laser, como monocromaticidade, coerência e colimação, a monocromaticidade é a única característica que não é perdida na interação da luz com o tecido. A coerência da luz não se manifesta quando os feixes interagem com o tecido a nível molecular, sendo que os fenômenos fotobiológicos são de natureza puramente não coerente (KARU, 2003; CAETANO et al, 2009). Sendo assim, a monocromaticidade é uma característica extremamente importante, já que define a profundidade de penetração da luz no tecido, responsável pelos efeitos fisiológicos e terapêuticos atribuídos a fototerapia (CAETANO et al, 2009).

A depender do tipo de Laser utilizado no tecido, pode resultar em efeito fotoquímico, fotofísico, fototérmico e fotomecânico (PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010). A fotobiomodulação tecidual depende dos efeitos fotoquímicos e fotofísicos promovidos pela luz. O efeito fotoquímico, induzido pela luz vermelha, está associado à absorção a nível mitocondrial e a reação fotofísica, promovida pela luz infravermelha, às alterações na permeabilidade da membrana celular que facilitam a mobilidade iônica e o aumento da produção de ATP. Porém, em ambas as situações, há aumento da atividade metabólica iniciando o processo de bioestimulação (PINHEIRO; BRUGNERA-JUNIOR; ZANIN, 2010). Sendo assim, tecidos imunodeficientes que apresentem potencial de membrana reduzido poderão ser beneficiados com a fototerapia, melhorando o metabolismo celular na cicatrização de feridas (MEDRADO et al, 2008; PINHEIRO et al, 2009).

A fototerapia Laser tem se destacado dentre os recursos mais utilizados em tratamentos médicos e odontológicos visando sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos (ROCHA JÚNIOR et al, 2006; RODRIGUES et al, 2009). Trata-se de um dos avanços utilizados para fotoativar mecanismos celulares e potencializar o metabolismo energético da mitocôndria (SOMMMER et al, 2001), levando à normalização das condições da região afetada através da redução do edema e indução de analgesia (MEDRADO et al, 2003; RODRIGUES et al, 2009).

Também é capaz de acelerar a reparação tecidual nas suas diferentes fases, modulando a resposta inflamatória, reduzindo ou acelerando a inflamação (ROCHA JÚNIOR et al, 2006; RODRIGUES et al, 2009), aumentando o número médio de vasos neoformados, melhorando a deposição de fibras colágenas e, conseqüentemente, a qualidade do tecido cicatricial (MELO et al, 2011).

A literatura tem demonstrado que a fototerapia Laser promove, a nível celular, o aumento do metabolismo celular, estimulando a neoangiogênese, a proliferação de células epiteliais e fibroblastos, síntese de colágeno e pró-colágeno, produção de outros componentes da matriz extracelular, o que resulta na aceleração da reparação dos tecidos lesados (WHELAN et al 2001; MEDRADO et al, 2003; DESMET et al, 2006; MELO et al, 2011). Em alguns estudos, os tecidos irradiados com Laser apresentaram resposta inflamatória aguda nos primeiros dias, com aumento de células polimorfonucleares, mastócitos e da vasodilatação, acelerando o processo inflamatório e a cicatrização (PEREIRA et al, 2010).

O Laser ao atuar nos fibroblastos também pode estimular a sua transformação em miofibroblastos, auxiliando a contração de feridas irradiadas (MARCHIONNI et al, 2010). Medrado et al. (2003) avaliaram o efeito do Laser diodo GaAlAs no espectro de ação de 670nm, ajustado a potência de 9mW, e fluências de 4 e 8 J/cm² no processo de reparo tecidual em dorso de ratos. Os autores observaram, através da análise imuno-histoquímica para miofibroblastos, que houve grande proliferação destas células, principalmente com 4J/cm². As diferenças estiveram presentes até o 7^o dia, e no 14^o dia, todos os animais apresentavam as feridas cicatrizadas.

Carvalho et al. (2006) analisaram a influência do Laser (λ 632,8 nm, 5mW, 0,025cm², 200mW/cm²) na cicatrização de feridas cutâneas confeccionadas em dorso de ratos diabéticos e não diabéticos. O protocolo de irradiação iniciou-se imediatamente após a confecção da ferida, utilizando a densidade de energia de 4J/cm² por 60 segundos, e foi repetida diariamente até a morte dos animais, correspondente ao 3^o, 7^o e 14^o dia pós-operatório. Os resultados revelaram que o Laser foi capaz de aumentar significativamente o percentual de colágeno nas feridas cutâneas, acelerando assim o processo de cicatrização tanto no grupo diabético quanto no grupo não diabético. Busnardo e Biondo-Simões (2010), em estudo similar, também avaliaram a influência do Laser vermelho no reparo tecidual, com

algumas diferenças no protocolo de irradiação ($\lambda 632,8\text{nm}$, 5mW , $0,015\text{cm}^2$, $333,3\text{mW/cm}^2$ e dose de 4J/cm^2 por 36 segundos), e observaram que houve melhora na deposição de colágeno na fase inicial do processo de cicatrização, já a maturação da ferida não foi afetada.

Rabelo et al. (2006) compararam o efeito do Laser ($\lambda 632,8\text{nm}$, 15mW , $0,025\text{cm}^2$, 600mW/cm^2 , 10J/cm^2 , 17 segundos) no reparo de feridas cirúrgicas criadas em ratos diabéticos e não diabéticos avaliados em 4, 7 e 15 dias. Os resultados demonstraram que o processo inflamatório nos grupos tratados foi menos intenso que no grupo controle. Além disso, a avaliação histológica demonstrou melhor reepitelização nos grupos tratados com a luz Laser no período de 7 e 15 dias, quando comparados ao grupo controle.

Melo et al. (2011), em estudo mais recente, avaliaram o efeito do Laser GaAIs ($\lambda 904\text{nm}$) na cicatrização de feridas em ratos. Os autores observaram que a fototerapia reduziu a intensidade da reação inflamatória, promovendo a mudança do padrão de infiltração de leucócitos polimorfonucleares para infiltração mononuclear. Além disso, houve aumento significativo do número médio de vasos neoformados e da deposição das fibras colágenas, melhorando o padrão organizacional do tecido.

A dosimetria ideal ainda é controversa e depende de fatores como distância entre a pele e o aparelho Laser, sistema óptico do aparelho, reflexão, transmissão, dispersão, absorção e profundidade do tecido tratado. A resposta celular à fotobiomodulação também depende do comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, potência, tempo e número de irradiações, intervalos de aplicação, duração do tratamento, frequência e diâmetro do raio (TUNÉR; HODE, 2002; PINHEIRO, 2009). Nesse caso, apesar de numerosos trabalhos confirmarem o uso do Laser como biomodulador, os parâmetros e protocolos considerados ideais para sua aplicação ainda não foram totalmente elucidados (RODRIGUES et al, 2009). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados, a fim de se estabelecer parâmetros e protocolos adequados aos pacientes, em cada caso.

2.4.2 LED

O termo LED é o acrônimo da expressão *Light Emitting Diode*, que significa Diodo Emissor de Luz (DALL AGNOL et al, 2009). O LED não possui efeito térmico

e atualmente representa uma nova intervenção terapêutica, não invasiva (DESMET et al, 2006; CORAZZA et al, 2007; WHELAN et al, 2001), que está sendo introduzida comercialmente como alternativa ao uso do Laser de baixa potência, no intuito de acelerar o reparo tecidual, uma vez que também melhora a produção e o metabolismo energético mitocondrial (DESMET et al, 2006; VINCK et al, 2003). Dessa forma, ao melhorar o processo natural de cicatrização de feridas, possibilita o retorno do paciente às suas atividades mais rapidamente (WHELAN et al, 2001).

O LED é um tipo de diodo semicondutor, constituído pela junção de dois materiais semicondutores, impregnados ou dopados com impurezas para criar uma estrutura chamada junção p-n (positivo-negativo), que emite luz em um determinado comprimento de onda, quando conectado a um circuito elétrico (MARTINS et al, 2007). Além disso, a maior parte da energia emitida está no espectro visível da luz e praticamente não gera calor (MARTINS et al, 2007; WHELAN et al, 2001).

Estes dispositivos emitem luz difusa monocromática de comprimento de onda eficaz para o reparo tecidual (WHELAN et al, 2003), podendo variar de 405nm (azul) a 940nm (infravermelho) dependendo do material semicondutor inorgânico que forma a junção p-n (MEYER et al, 2010). No entanto, ainda que vários estudos atestem a efetividade da radiação eletromagnética coerente na região do vermelho, a terapia com LEDs é pouco abordada principalmente na área clínica (WOLLMANN; NICOLAU, 2009).

Alguns pesquisadores demonstraram a aplicabilidade do LED terapêutico em estudos experimentais e clínicos, ainda que poucos, evidenciando a eficiência fotobiomoduladora celular semelhante à do Laser (VINCK et al, 2003). Contudo, o LED diferencia-se do Laser no processo de formação da luz, devido à inexistência de uma cavidade óptica (KARU, 2003), pois, quando o diodo do Laser está contido dentro da cavidade ressonante, promove fótons que são amplificados pela emissão estimulada da luz e proporciona feixes de luz coerente e colimado (CORAZZA, 2005). No LED, não existe esta cavidade óptica, desprovido a luz de coerência e colimação (KARU, 2003), ainda que produza banda de espectro eletromagnético próxima à do Laser (CORAZZA, 2005).

Os aparelhos de LED são frequentemente configurados com diodos agrupados emitindo dois ou mais comprimentos de onda em um único aplicador com áreas de aplicação de tamanhos variados, ao contrário do Laser que possui um

único comprimento de onda, é coerente e apresenta uma área de aplicação pequena (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; DEMEST et al, 2006).

Como o espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo que o do Laser, possui menor energia por faixa espectral, visto que a densidade de energia está distribuída em uma banda eletromagnética maior, podendo interagir com maior grupo de fotorreceptores específicos. Mesmo diante destas diferenças, há concentração similar de energia na área de ação de ambas, porém com distribuição diferenciada. Contudo, a janela biológica de absorção da luz nos tecidos biológicos diante da aplicação de luzes terapêuticas é ampla, o que permite a ação biomoduladora nos respectivos receptores de luz (CORAZZA, 2005).

Com a crescente aceitação de luz não coerente para a fototerapia, o valor da coerência na obtenção de resultados benéficos com a luz tem sido amplamente discutido (ENWEMEKA, 2006). A coerência é retida ao longo dos primeiros extratos da pele, antes que produza a absorção da luz por moléculas fotorreceptoras especializadas (melanina, porfirina, citocromo c oxidase e hemoglobina) (KARU, 2003). Por outro lado, alguns estudos afirmam que a coerência é de fundamental importância para a promoção dos efeitos terapêuticos proporcionados pela luz (ENWEMEKA, 2006).

A fototerapia LED atua na modulação da atividade celular, promovendo a aceleração da cicatrização de feridas, além de possuir efeito anti-inflamatório e analgésico. Esta luz ainda age sobre a síntese de ATP em mitocôndrias estimuladoras e aumenta a síntese de colágeno pelos fibroblastos (WEISS et al, 2005). Desta forma, ao estimular o fotorreceptor citocromo c oxidase e o metabolismo oxidativo mitocondrial, a fototerapia LED aumenta o metabolismo energético que acelera o reparo celular e tecidual (DESMET et al, 2006).

Pesquisas têm demonstrado resultados satisfatórios acerca dos efeitos da terapia com LEDs em processos de reparo tecidual e sua eficiência é comparada ao do Laser (CORAZZA et al, 2007). Os protocolos terapêuticos dessas novas fontes de luz não estão bem estabelecidos, porém podem ser similares aos do Laser, tais como comprimento de onda, densidade de energia ou fluência e outros parâmetros a serem considerados (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

Estudos *in vitro*, utilizando a fototerapia LED com diferentes comprimentos de onda, têm demonstrado aumento significativo do crescimento celular em linhagens celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais. Em culturas de

fibroblastos irradiadas com LED, foi observado que as células respondem à fototerapia, apenas quando estão na fase de crescimento, não demonstrando mudança significativa na fase estacionária, na qual há inibição do crescimento celular devido ao contato célula-célula. *In vivo*, também tem sido observado que, durante o reparo do tecido, a proliferação celular pára quando a cicatrização se completa. Dessa forma, é importante notar que o tratamento com LED acelera a cicatrização de tecidos sem produzir supercrescimento ou transformação neoplásica (WHELAN et al, 2001).

O estudo *in vitro* realizado por Vinck et al. (2003), utilizando culturas de fibroblastos irradiadas com Laser GaAIs ($\lambda 670\text{nm}$) e LEDs emitindo comprimentos de onda verde ($\lambda 570\text{ nm}$), vermelho ($\lambda 660\text{ nm}$) e infravermelho ($\lambda 950$), durante três dias consecutivos, também evidenciaram aumento na proliferação de fibroblastos, quando comparadas aos controles não irradiados, principalmente nas primeiras 24 horas. Os melhores resultados foram obtidos com o LED verde, seguido da luz LED vermelha, infravermelha e luz Laser. Estes resultados sugerem possível efeito estimulador sobre a cicatrização dos tecidos *in vivo*.

Em estudo *in vivo* realizado por De Sousa et al. (2010), foi avaliado histologicamente, o efeito da fototerapia LED em diferentes comprimentos de onda sobre a proliferação fibroblástica no processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais criadas em dorso de ratos. Os grupos tratados foram irradiados com a luz LED emitida nos comprimentos de onda vermelho ($\lambda 700\pm 20\text{nm}$), verde ($\lambda 530\pm 20\text{nm}$) e azul ($\lambda 460\pm 20\text{nm}$), com a aplicação de $10\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão. A irradiação foi iniciada logo após o procedimento cirúrgico e repetida a cada dois dias, durante 7 dias. Os autores observaram que os LEDs vermelho e verde foram mais eficazes, uma vez que mostraram aumento significativo no número de fibroblastos, quando comparados com o grupo controle.

Meyer et al. (2010) avaliaram os efeitos do LED verde ($\lambda 515\text{-}525\text{nm}$) e LED vermelho ($\lambda 620\text{-}630\text{ 20nm}$) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos no período experimental de 7 dias. O protocolo de irradiação iniciou-se 24 horas após a confecção da ferida e foi repetido diariamente durante 5 dias, totalizando 5 sessões. Os autores observaram que os melhores efeitos anti-inflamatórios e a reepitelização da ferida, associada à formação de cicatrizes com melhor qualidade, ocorreram com o LED vermelho, que promoveu maior deposição de colágeno. Quanto ao tecido de

granulação, este se mostrou mais desenvolvido nos grupos irradiados do que no grupo controle, e a quantidade de células inflamatórias predominaram com a fototerapia verde.

Whelan et al. (2001) também avaliaram os efeitos da fototerapia LED com diferentes comprimentos de onda (680nm, 730nm e 880nm, 4J/cm², 50mW/cm²) na cicatrização de feridas em ratos diabéticos e observaram que os grupos irradiados apresentaram taxa de cicatrização superior ao do grupo controle não irradiado.

Al-Watban e Andres (2003) analisaram a cicatrização de queimaduras em ratos diabéticos sob tratamento com a luz LED policromática (272mW, 13,6mW/cm²). Trinta ratos foram divididos, aleatoriamente, nos grupos controle e grupos irradiados com 5, 10, 20 e 30J/cm². As respectivas doses foram aplicadas logo após a indução da queimadura e se repetiram três vezes por semana durante 21 dias. Os resultados mostraram que o LED não teve efeito na melhoria da cicatrização dos ratos não diabéticos, entretanto, nos diabéticos houve relativa estimulação no reparo da queimadura quando comparado com o controle diabético.

Já em estudo mais recente, Al-Watban (2009) comparou os efeitos das fototerapias Laser (532, 633, 810, 980 e 10600nm) e LED (510-543, 594-599, 626-639, 640-670 e 842-872 nm), variando do vermelho ao infravermelho, em queimaduras e feridas cirúrgicas excisionais confeccionadas no dorso de ratos diabéticos e não diabéticos. Para cada comprimento de onda utilizado, cada grupo foi irradiado com densidades de energia de 5, 10, 20 e 30 J/cm², a cada 48h, durante 7 dias, e os autores observaram que o Laser 633nm apresentou os melhores resultados, acelerando o processo de cicatrização.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através de análise histológica e imuno-histoquímica, os efeitos das fototerapias Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) no reparo tecidual de feridas cutâneas excisionais confeccionadas em dorso de ratos hipotireoidianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a influência das fototerapias Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$), com densidade de energia de $24\text{J}/\text{cm}^2$, no reparo tecidual em ratos hipotireoidianos, através da análise histológica da reepitelização, do processo inflamatório, da proliferação fibroblástica, da deposição colagênica e da neoangiogênese, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias .

Verificar a influência das fototerapias Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$), com densidade de energia de $24\text{J}/\text{cm}^2$, no reparo tecidual em ratos hipotireoidianos, através da análise da expressão imuno-histoquímica do colágeno tipo I e III, no período experimental de 7 e 14 dias .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Nesta pesquisa foram respeitados os princípios éticos e legais de conduta de experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivissecção dos mesmos, de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

O protocolo da pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), tendo parecer favorável (ANEXO A).

4.2 AMOSTRA

Nesta pesquisa foram utilizados 72 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem Roedentia, da linhagem *Wistar*, machos, adultos jovens com aproximadamente dois meses de idade e peso variando entre 220 e 270 gramas, obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (FAMED/UFBA).

Os procedimentos e a manutenção dos ratos foram realizados no biotério de experimentação animal do Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA). Estes foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, contendo no máximo três ratos em cada, em local livre de ruídos, com condições normais de umidade, temperatura média de 25° C e luminosidade, em ciclos iguais de exposição à luz e à escuridão.

As gaiolas foram forradas com maravalha e trocadas periodicamente, a cada 48 horas, propiciando, assim, condições favoráveis de higiene e preenchendo os requisitos físico-químicos para a saúde e bem-estar dos animais. A alimentação constituiu-se em ração comercial para roedores (Labina®, Agribbrands-Purina Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

4.2.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (Eutireoidiano e Hipotireoidiano), e estes divididos em três subgrupos, com 12 animais cada,

avaliados em dois tempos experimentais pós-operatórios (sete e 14 dias), de acordo com a condição sistêmica e protocolo de irradiação (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição dos ratos nos grupos experimentais de acordo com a sua condição sistêmica, protocolo de irradiação e período experimental (UFBA, 2012).

GRUPO	CONDIÇÃO SISTÊMICA	PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO	TEMPO EXPERIMENTAL	n
EC	Eutireoidiano	Controle (não irradiado)	7 e 14 dias	12
EL	Eutireoidiano	Laser GaAIs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 24J/cm ² , CW, $\varnothing=0,04\text{cm}^2$)	7 e 14 dias	12
ED	Eutireoidiano	LED InGaAIP ($\lambda 630 \pm 20\text{nm}$, 24J/cm ² , 150mW, CW, $\varnothing=0.5\text{cm}^2$)	7 e 14 dias	12
HC	Hipotireoidiano	Controle (não irradiado)	7 e 14 dias	12
HL	Hipotireoidiano	Laser GaAIs ($\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 24J/cm ² , CW, $\varnothing=0,04\text{cm}^2$)	7 e 14 dias	12
HD	Hipotireoidiano	LED InGaAIP ($\lambda 630 \pm 20\text{nm}$, 24J/cm ² , 150mW, CW, $\varnothing=0.5\text{cm}^2$)	7 e 14 dias	12

4.3 INDUÇÃO AO HIPOTIREOIDISMO

O método escolhido para indução dos ratos ao hipotireoidismo foi realizado através da administração oral diária de Propiltiouracil 100mg (PTU, *Biolab*®, Taboão da Serra, SP, Brasil) diluído em água (0,05g/100mL), durante 4 semanas, e mantida até a finalização do período experimental. Este modelo já está consolidado na literatura como um método simples e eficaz na indução desta disfunção endócrina (RODRIGUEZ; RAMALHO; DANTAS, 2009; RAMALHO et al., 2010).

Após 4 semanas da realização da indução, e ao fim do período experimental, amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia jugular dos ratos (Figura 1), sob anestesia geral, no momento do procedimento cirúrgico, para dosagem plasmática do hormônio tireoidiano T₄ e confirmação da indução ao hipotireoidismo. O grupo eutireoidiano recebeu água *ad libitum* sem adição de PTU, e amostras de sangue também foram coletadas nos mesmos períodos que os do grupo hipotireoidiano, para efeito comparativo quanto à normalidade dos níveis séricos deste hormônio no grupo não induzido ao hipotireoidismo.

As amostras de plasma foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Rafael e a dosagem plasmática do hormônio T₄ foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando kits comerciais adquiridos da Ortho-

Clinical Diagnostics (*Johnson & Johnson* Produtos Profissionais Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL

O acompanhamento do peso corporal de cada rato foi realizado através de pesagens durante todo o período experimental com o objetivo de avaliar e acompanhar a indução ao hipotireoidismo, devido às alterações de peso relacionadas à disfunção tireoidiana, além do bem estar animal. Os ratos do grupo eutireoidiano e hipotireoidiano foram pesados três vezes por semana, no momento da manutenção das gaiolas, e obtido uma média destes valores, que foram comparados.

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os ratos foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®, Syntec, Cotia, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®, Syntec, Cotia, SP, Brasil) na dosagem de 80mg/Kg e 14mg/Kg, respectivamente. Em seguida, com os animais posicionados em decúbito ventral, foi realizada a tricotomia manual da região média do dorso e anti-sepsia da área cirúrgica com Digluconato de Clorexidina a 2% (Merthiolate®, Hypermarcas S.A., Barueri, SP, Brasil). Em todos os animais foram confeccionadas feridas cutâneas excisionais padronizadas de 1cm², deixadas sem sutura para cicatrizar por segunda intenção. Para a confecção da ferida cirúrgica padronizada foram utilizados dois cabos de bisturi dispostos paralelamente e unidos entre si, mantendo uma distância de 1 cm entre as lâminas de bisturi nº 15 acopladas (Figura 2 à 5).

Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos individualmente em suas respectivas gaiolas plásticas, devidamente identificadas de acordo com o grupo ao qual faziam parte, e mantidos em constante observação até a finalização do período experimental.



Figura 1: Coleta da amostra de sangue através da punção da veia jugular (UFBA, 2012).



Figura 2: Instrumental utilizado para a confecção da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).



Figura 3: Delimitação dos pontos correspondentes ao ângulo da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).

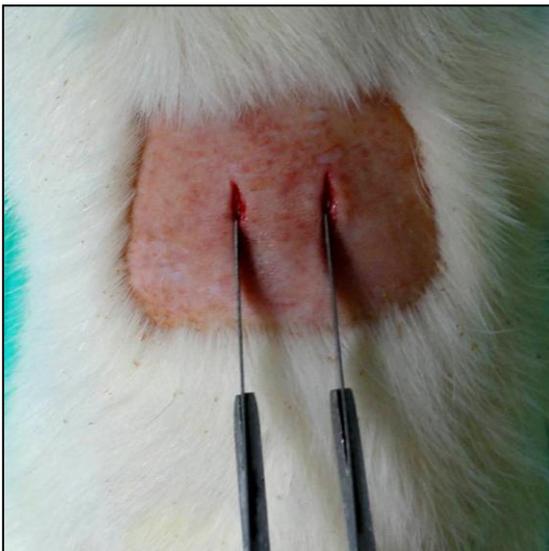


Figura 4: Confecção da ferida cirúrgica (UFBA, 2012).



Figura 5: Aspecto da ferida cirúrgica imediatamente após a sua confecção (UFBA, 2012).

4.6 IRRADIAÇÃO COM LASER E LED

O protocolo de irradiação nos grupos irradiados com Laser (EL e HL) ou LED (ED e HD) iniciou-se imediatamente após a confecção da ferida cutânea excisional e foi repetido em sessões com intervalo de 48 horas, durante sete ou 14 dias, a depender do período experimental. A densidade de energia total por sessão foi de $24\text{J}/\text{cm}^2$, perfazendo uma dose total de tratamento de $96\text{J}/\text{cm}^2$ e $168\text{J}/\text{cm}^2$, ao final dos períodos experimentais de sete e 14 dias, respectivamente. No intuito de garantir maior absorção da energia, as irradiações foram realizadas por contato, com a ponteira posicionada perpendicularmente ao tecido irradiado.

O aparelho de Laser utilizado nessa pesquisa foi o diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), modelo *Twin Flex Evolution*® (MMoptics, São Carlos, SP, Brasil), com emissão de radiação contínua (*Continuous Wave*), no comprimento de onda vermelho ($\lambda 660\text{nm}$), potência de 40mW e área de saída do feixe na ponteira de $0,04\text{cm}^2$. As irradiações foram realizadas de forma pontual em quatro pontos correspondentes aos ângulos da ferida, o mais próximo de suas bordas, e em cada ponto foi depositada a densidade de energia de $6\text{J}/\text{cm}^2$ com o tempo de aplicação de 2 minutos e 30 segundos, totalizando $24\text{J}/\text{cm}^2$ e um tempo de aplicação total de 10 minutos por sessão (Figura 6).

O aparelho de LED utilizado foi o Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio (InGaAlP), modelo *FisioLED*® (MMoptics, São Carlos, SP, Brasil), com emissão de radiação contínua (*Continuous Wave*), no comprimento de onda vermelho ($\lambda 630\ 20\pm 20\text{nm}$), potência de 150mW e área de saída do feixe na ponteira de $0,5\text{cm}^2$. As irradiações foram realizadas em um único ponto sobre a área da ferida, sendo depositada a densidade de energia de $24\text{J}/\text{cm}^2$ com o tempo de aplicação de 1 minuto e 20 segundos por sessão (Figura 7).

Os parâmetros empregados nos protocolos de irradiação estão disponibilizados no Quadro 2.

Quadro 2: Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação (UFBA, 2012).

GRUPOS PARÂMETROS	EUTIREOIDIANO E HIPOTIREOIDIANO CONTROLE		EUTIREOIDIANO E HIPOTIREOIDIANO LASER		EUTIREOIDIANO E HIPOTIREOIDIANO LED	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Comprimento de onda (nm)	-	-	660nm	660nm	630 20±20nm	630 20±20nm
SAEF (J/cm ² - sessão)	-	-	24J/cm ²	24J/cm ²	24J/cm ²	24J/cm ²
SAEF (J/cm ² - tratamento)	-	-	96J/cm ²	168J/cm ²	96J/cm ²	168J/cm ²
Potência Output (mW)	-	-	40mW	40mW	150mW	150mW
Área do tecido iluminada (cm ²)	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²	1 cm ²
Área do Spot (cm ²)	-	-	0,04cm ²	0,04cm ²	0,5cm ²	0,5cm ²
Irradiância (mW/cm ²)	-	-	1000mW/cm ²	1000mW/cm ²	300mW/cm ²	300mW/cm ²
Tempo de irradiação (sessão)	-	-	10 min	10 min	1min 20 s	1 min 20 s
Tempo de irradiação (tratamento)	-	-	40 min	70 min	5 min 20 s	9 min 20 s

**Figura 6:** Irradiação da ferida cirúrgica com a luz Laser de emissão vermelha (UFBA, 2012).**Figura 7:** Irradiação da ferida cirúrgica com a luz LED de emissão vermelha (UFBA, 2012).

4.7 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Ao final do período experimental para cada grupo (sete ou 14 dias), os ratos foram submetidos a overdose anestésica, através da associação de cloridrato de quetamina (Cetamin®) com xilazina (Xilazin®), via jugular. Constatada a morte dos mesmos, a partir da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, as peças foram removidas através de uma excisão realizada ao redor da ferida com margem de tecido de 1cm, e acondicionadas em frascos plásticos devidamente identificados contendo formol a 10%, com volume aproximadamente igual a cinco vezes o volume da peça, onde permaneceram por 24h para sua fixação. Em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), onde foram processadas.

4.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o período de fixação, as peças foram submetidas ao processamento de acordo com a rotina para inclusão em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 4µm, e submetidos à coloração histológica pela Hematoxilina-Eosina (HE), para análise do processo inflamatório, do grau de reepitelização, proliferação fibroblástica, tecido de granulação e neoangiogênese, e pelo Picrosírius, para análise de fibras colágenas.

Os espécimes processados foram então avaliados em microscopia de luz (AxioStar®, Zeiss, Germany) através de análise semiquantitativa descritiva comparativa por um patologista experiente do Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da FOUFBA. A avaliação histológica foi realizada em estudo cego de acordo com os critérios encontrados no Quadro 3.

Quadro 3: Critérios utilizados na análise histológica (UFBA, 2012).

Variáveis	Scores		
Reepitelização	Reepitelização ausente	Reepitelização recobrimdo menos da metade da ferida Reepitelização recobrimdo mais da metade da ferida Reepitelização recobrimdo toda a ferida, com espessura irregular Reepitelização recobrimdo toda a ferida, com espessura regular	
Inflamação Aguda	Discreta Presença de até 25% de neutrófilos na área	Moderada Presença de 25 a 50% de neutrófilos na área	Intensa Presença superior a 50% de neutrófilos na área
Inflamação Crônica	Discreta Presença de até 25% de células inflamatórias crônicas na área	Moderada Presença de 25 a 50% de células inflamatórias crônicas na área	Intensa Presença superior a 50% de células inflamatórias crônicas na área
Angiogênese	Discreta Quantidade de vasos sanguíneos inferior ao tecido adjacente normal	Moderada Quantidade de vasos sanguíneos similar ao tecido adjacente normal	Intensa Quantidade de vasos sanguíneos superior ao tecido adjacente normal
Fibroblastos	Discreta Presença de até 25% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.	Moderada Presença de 25 a 50% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.	Intensa Presença superior a 50% de fibroblastos em relação a outros tipos celulares do tecido.
Tecido de Granulação	Discreta Presença discreta de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias	Moderada Presença moderada de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias	Intensa Presença intensa de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias
Deposição de colágeno	Presença de até 25% de deposição de fibras colágenas na área	Presença de 25 a 50% de deposição de fibras colágenas na área	Presença superior a 50% de deposição de fibras colágenas na área
Maturação de colágeno	Discreta O tom do contra-corante predomina, sendo a cor do corante menor intensa que o observado no tecido normal adjacente	Moderada Predomina a coloração do corante sobre o contra-corante, sendo a cor do corante similar à do tecido normal adjacente	Intensa Marcação do contra corante é igual ou mais intensa que o observado no tecido normal adjacente
Distribuição das fibras colágenas	Regular Distribuição regular das fibras colágenas quando comparadas ao tecido normal adjacente		Irregular Distribuição irregular das fibras colágenas quando comparadas ao tecido normal adjacente

4.9 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (LPM/FOUSP), utilizando o método da imunoperoxidase com polímero marcado para os anticorpos primários colágeno I e colágeno III, com o objetivo de avaliar a expressão destes tipos de colágeno, caracterizando o tecido neoformado.

Secções de 4µm foram obtidas e os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano 2% em etanol absoluto) e, posteriormente, armazenados em estufa a 60°C por no mínimo 24 horas para sua melhor fixação. Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol e hidratados em quatro banhos de etanol, três banhos em concentrações de 100% e um banho em concentração de 70%, seguido da incubação em PBS 1X (pH 7,4).

A inativação de cargas livres foi realizada com incubação em Borax 1% e o bloqueio da peroxidase endógena em peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS, por 40 minutos. Após recuperação antigênica por meio de imersão em tampão citrato-fosfato (P4809, pH 6,0; Sigma, St Louis, MO, USA) por 20 minutos a 95°C em banho-maria, os cortes foram incubados com os anticorpos monoclonais de camundongo para colágeno I (clone COL-1 ab90395, Abcam, Cambridge, MA, USA) e colágeno III (clone FH-7A, ab6310, Abcam, Cambridge, MA, USA) diluídos em PBS-BSA 0,1% nas diluições 1:300 e 1:700, respectivamente, a 4°C por 18 horas (Quadro 4).

Após este período, através do método polímero marcado (EnVision, DAKO), o kit EnVision™ + Dual Link System Peroxidase (K4061; DAKO, Glostrup, Denmark) foi aplicado como sistema de detecção para os anticorpos anti-colágeno I e anti-colágeno III, durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados 2 vezes com solução tampão PBS (pH 7,4) acrescido de Triton 0,1%.

A reação foi revelada com 3,3'-Diaminobenzidina (K3468, Dako Liquid DAB Plus; Dako), por 10 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Foram utilizados como controles da reação, cortes de mucosa e pele com reatividade reconhecidamente positiva para os anticorpos anti-colágeno I e III, respectivamente, e que foram incubados juntamente com os grupos experimentais. Os controles

negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por soro não imune, obtendo-se imunomarcção completamente negativa (Quadro 4).

A avaliação imuno-histoquímica também foi realizada sob microscopia de luz (AxioStar®, Zeiss, Germany) em estudo cego por um patologista experiente, de forma semi-quantitativa, de acordo com a intensidade da imunomarcção do colágeno tipo I ou tipo III, sendo classificados em marcação ausente (-), discreta (+), moderada (++) e intensa (+++) de acordo com os critérios encontrados no Quadro 5.

Quadro 4: Especificidade dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas (UFBA, 2012).

Anticorpo	Anti Colágeno I	Anti Colágeno III
Clone	COL-1	FH-7A
Tipo	Monoclonal	Monoclonal
Marca comercial	Abcam	Abcam
Recuperação antigênica	Citrato fosfato (pH 6,0)	Citrato fosfato (pH 6,0)
Tempo e forma de recuperação	Banho-maria, 20 minutos	Banho-maria, 20 minutos
Diluição	1:300	1:700
Incubação	18 horas	18 horas
Controle Positivo	Mucosa	Pele

Quadro 5: Critérios utilizados na análise imuno-histoquímica (UFBA, 2012).

Anticorpo	Scores			
Anti Colágeno I	Ausente (-) Ausência de imunomarcção do colágeno I quando comparado ao tecido normal adjacente	Discreto (+) Imunomarcção do colágeno I é menos intensa que o observado no tecido normal adjacente	Moderado (++) Imunomarcção do colágeno I é similar ao observado no tecido normal adjacente	Intenso (+++) Imunomarcção do colágeno I é igual ou mais intensa que o observado no tecido normal adjacente
Anti Colágeno III	Ausente (-) Ausência de imunomarcção do colágeno III quando comparado ao tecido normal adjacente	Discreto (+) Imunomarcção do colágeno III é menos intensa que o observado no tecido normal adjacente	Moderado (++) Imunomarcção do colágeno III é similar ao observado no tecido normal adjacente	Intenso (+++) Imunomarcção do colágeno III é igual ou mais intensa que o observado no tecido normal adjacente

4. 10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel e analisados estatisticamente com auxílio do programa Minitab®. Para a comparação intra e inter-grupo foi utilizado o teste não paramétrico Exato de Fisher, considerando uma significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E PONDERAL

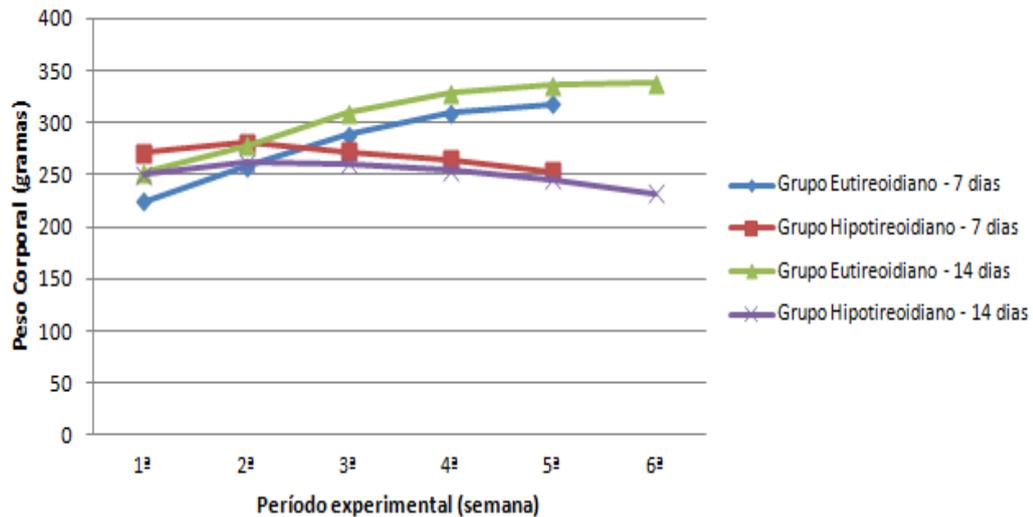
No grupo hipotireoidiano, a dosagem plasmática do hormônio tireoidiano T₄ foi de $0,66 \pm 0,06$ mg/dl, enquanto que no grupo eutireoidiano foi de $2,92 \pm 0,40$ mg/dl. Tais valores demonstram que os níveis do hormônio tireoidiano T₄, observados no grupo hipotireoidiano, foram inferiores aos níveis observados no grupo eutireoidiano, confirmando a indução ao hipotireoidismo.

A avaliação ponderal demonstrou que houve redução do crescimento do peso corporal no grupo hipotireoidiano em relação ao grupo eutireoidiano. Os ratos eutireoidianos do grupo avaliado no pós-operatório de 7 dias ganharam em média 42,03% do peso corporal inicial, enquanto que nos ratos induzidos ao hipotireoidismo foi observado percentual de crescimento negativo (-7,32%), no mesmo período. No grupo avaliado em 14 dias, também foi observado maior percentual de crescimento no grupo eutireoidiano, equivalente ao aumento de 34,36% do peso corporal inicial, enquanto que no grupo hipotireoidiano houve percentual de crescimento negativo em relação ao peso corporal inicial (-7,43%) (Tabela 1). A evolução do peso corporal ao longo das 5 e 6 semanas de experimento pode ser observada na Figura 8.

Tabela 1: Evolução do peso corporal médio (g), desvio padrão e percentual de crescimento (%) do peso corporal dos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos avaliados no pós-operatório de 7 e 14 dias (UFBA, 2012).

	Grupos experimentais			
	Eutireoidiano 7 dias	Hipotireoidiano 7 dias	Eutireoidiano 14 dias	Hipotireoidiano 14 dias
1ª semana	224,17 ± 6,54 g	251,67 ± 12,48g	246,02 ± 6,81 g	250,46 ± 5,93 g
2ª semana	257,87± 10,09 g	277,69± 11,88 g	255,37 ± 1,79 g	262,04 ± 4,78 g
3ª semana	288,24 ± 7,71 g	308,89 ± 10,18g	247,50 ± 4,09 g	260,93 ± 3,63 g
4ª semana	309,17 ± 6,24 g	328,52 ± 6,78 g	239,17 ± 1,55 g	253,61 ± 1,92 g
5ª semana	318,15± 5,32 g	336,11 ± 2,65 g	228,33 ± 9,67 g	245,56 ± 7,55 g
6ª semana	-	337,96 ± 3,31 g	-	231,85± 3,26 g
Percentual de crescimento (%)	42,03	34,36	-7,32	-7,43

Figura 8: Representação gráfica da variação do peso corporal médio dos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos ao longo do experimento (UFBA, 2012).



5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

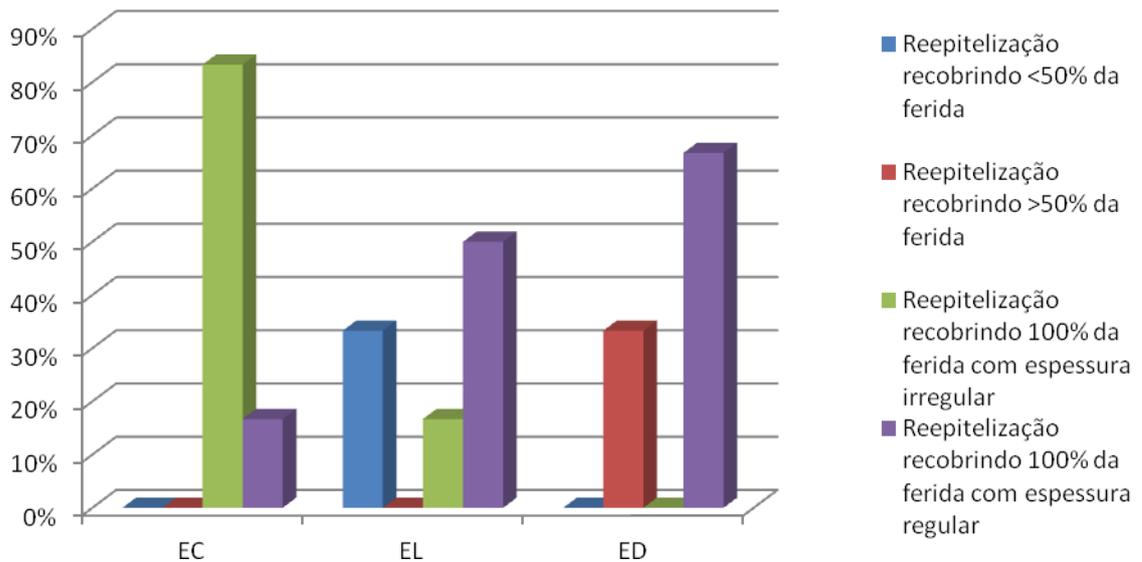
GRUPOS AVALIADOS EM 7 DIAS

Nos grupos eutireoidianos, em relação à reepitelização, observou-se recobrimento total da ferida com epitélio de espessura irregular em 83,3% dos casos do grupo EC, enquanto que os grupos irradiados EL e ED revelaram predomínio de recobrimento total da ferida com epitélio de espessura regular, respectivamente, em 50% e 66,7% da amostra (Figuras 9, 11 e 13). Nos grupos hipotireoidianos, o grupo HC demonstrou padrão bem definido com repavimentação epitelial incompleta recobrimdo mais da metade da ferida em todos os casos. Nos grupos irradiados HL e HD houve recobrimento total da ferida em 60% e 66,6% dos casos, respectivamente, com predomínio de epitélio de espessura regular (Figuras 15, 17 e 19).

A análise estatística, quando aplicada à variável reepitelização, revelou reepitelização significativamente maior para os grupos irradiados EL ($p=0,02$) e ED ($p=0,00$) quando confrontados com o grupo EC (Figura 21). Os grupos irradiados HL ($p=0,04$) e HD ($p=0,01$) também se diferiram estatisticamente do grupo não irradiado HC, apresentando maior grau de reepitelização (Figura 22). Quando os grupos eutireoidianos (EC, EL e ED) foram comparados aos respectivos grupos hipotireoidianos (HC, HL e HD), observou-se que o grupo EC apresentou grau de reepitelização ($p=0,00$) significativamente maior que o grupo HC (Figura 23). Não

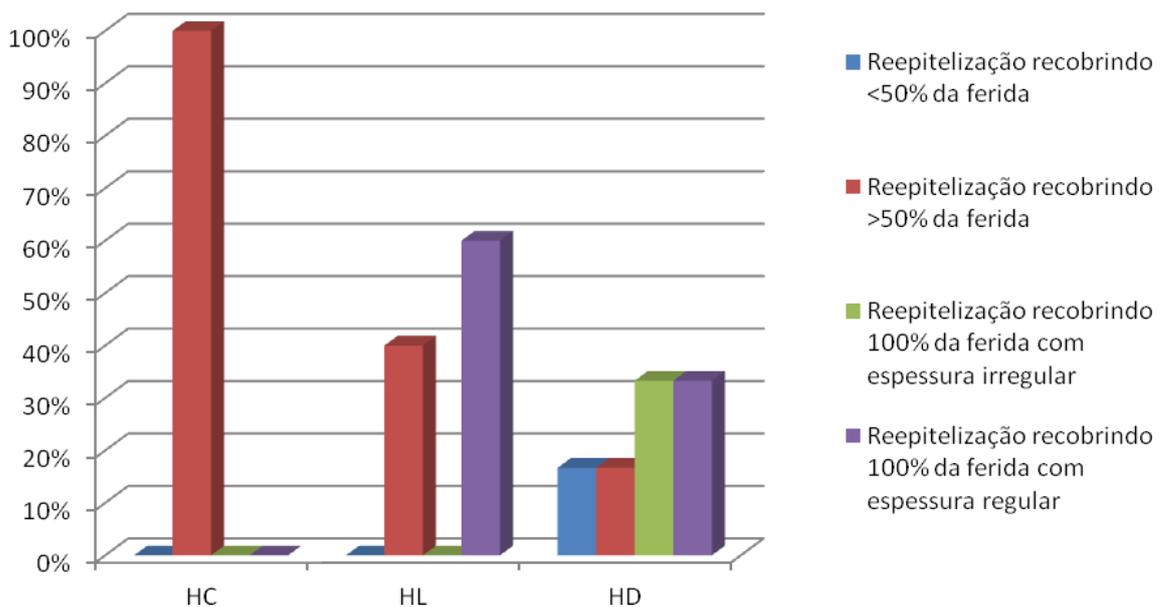
houve diferença estatisticamente significante quando os grupos irradiados foram confrontados entre si, na avaliação intra e intergrupo ($p>0,05$).

Figura 21: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à reepitelização (UFBA, 2012).



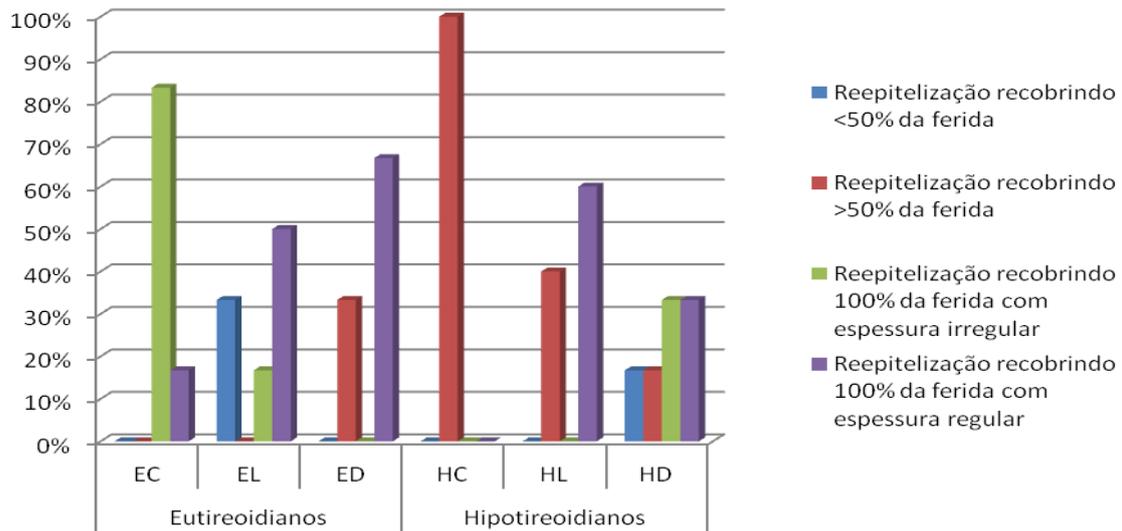
Reepitelização: $p=0,02$ (EL x EC); $p=0,00$ (ED x EC)

Figura 22: Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à reepitelização (UFBA, 2012).



Reepitelização: $p=0,04$ (HL x HC); $p=0,01$ (HD x HC)

Figura 23: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à reepitelização (UFBA, 2012).



Reepitelização: $p=0,00$ (EC x HC)

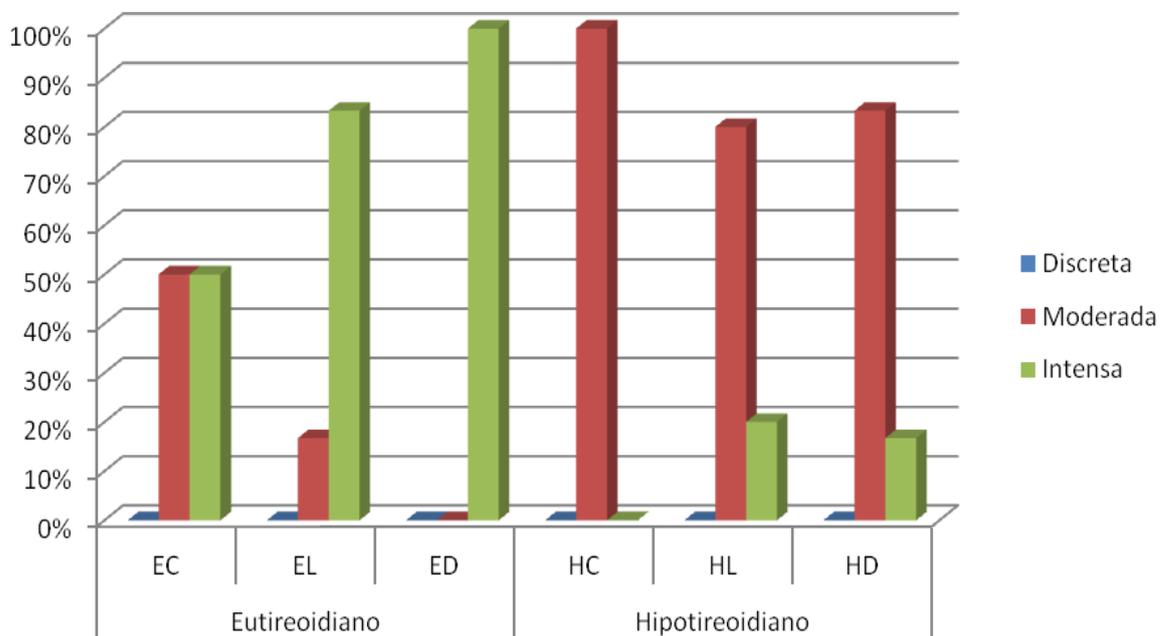
Quanto à presença do infiltrado inflamatório agudo e crônico, no grupo EC, verificou-se que estes se apresentaram, respectivamente, como discreto (100%) e moderado (83,3%). O infiltrado inflamatório agudo foi predominantemente discreto nos grupos irradiados EL (83,3%) e ED (66,7%), enquanto que o infiltrado inflamatório crônico demonstrou-se discreto (66,7%) e moderado (83,3%), respectivamente. No grupo HC houve predomínio de infiltrado inflamatório agudo discreto (80%) e crônico intenso (60%). Nos grupos hipotireoidianos irradiados, verificou-se que o infiltrado inflamatório agudo foi discreto em todos os casos do grupo HL e variou entre discreto (50%) e moderado (50%) no grupo HD. Já o infiltrado inflamatório crônico foi predominantemente moderado em ambos os grupos (60% e 50%, respectivamente). A análise estatística em relação à variável inflamação revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p>0,05$).

Nos grupos eutireoidianos, a proliferação de fibroblastos no grupo EC, mostrou-se moderada em 50% dos casos, e na outra metade a proliferação foi intensa. Esta variável foi considerada predominantemente intensa nos grupos irradiados EL (83,3%) e ED (100%). Nos grupos hipotireoidianos, observou-se que a

proliferação de fibroblastos foi moderada em 100% dos casos no grupo HC, e que os grupos irradiados demonstraram deposição mais intensa, apesar do predomínio da proliferação moderada nos grupos HL (80%) e HD (83,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos irradiados foram confrontados entre si e com o grupo controle na avaliação intragrupo ($p > 0,05$). Na avaliação intergrupo, quando os grupos eutireoidianos foram comparados com os grupos hipotireoidianos, a análise estatística revelou que os grupos irradiados EL e ED apresentaram proliferação fibroblástica mais intensa que o grupo HC ($p = 0,00$ e $p = 0,00$, respectivamente) (Figura 24).

A angiogênese foi inferior nos grupos irradiados com Laser e LED, porém não significativo estatisticamente ($p > 0,05$).

Figura 24: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).

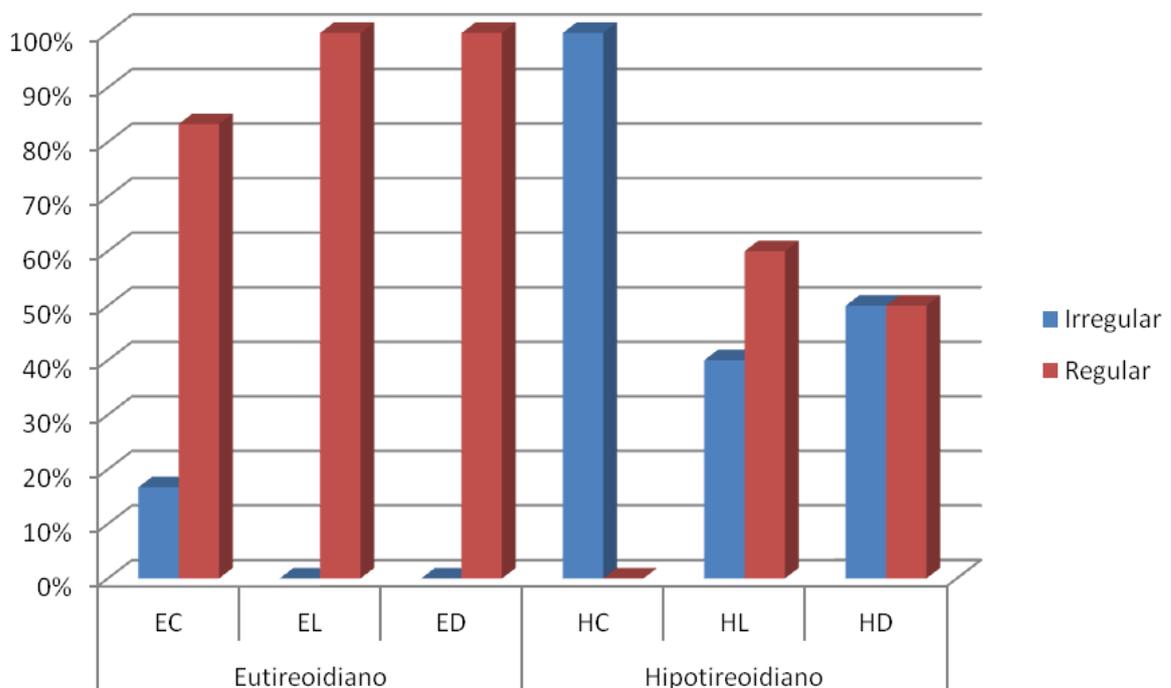


Fibroblastos: $p = 0,00$ (EL x HC); $p = 0,00$ (ED x HC)

Em relação à quantidade de tecido de granulação, deposição e maturação das fibras colágenas, os melhores resultados foram observados para os grupos irradiados, eutireoidianos ou hipotireoidianos, exceto quando o grupo HL foi comparado ao grupo HC, porém sem significância estatística em ambas as comparações ($p>0,05$).

O padrão de distribuição das fibras colágenas foi predominantemente regular nos grupos eutireoidianos controle (83,3%) e irradiados com Laser (100%) e LED (100%) (Figuras 10, 12 e 14), e nos grupos hipotireoidianos irradiados com Laser (60%) e LED (50%), sendo a distribuição colagênica irregular em todos os casos do grupo hipotireoidiano controle (Figuras 16, 18 e 20). A análise estatística revelou que os grupos EC, EL e ED demonstraram distribuição regular das fibras colágenas com diferença estatisticamente significativamente do grupo HC ($p=0,01$, $p=0,00$ e $p=0,00$, respectivamente) (Figura 25).

Figura 25: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à distribuição das fibras colágenas (UFBA, 2012).



Distribuição de fibras colágenas: $p=0,01$ (EC x HC); $p=0,00$ (EL x HC); $p=0,00$ (ED x HC)

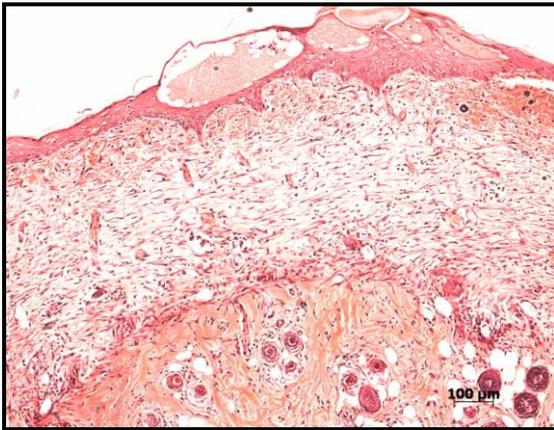


Figura 9: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico de intensidade moderada (HE, 100X). (UFBA, 2012).



Figura 10: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição moderada e distribuição regular das fibras colágenas. (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).

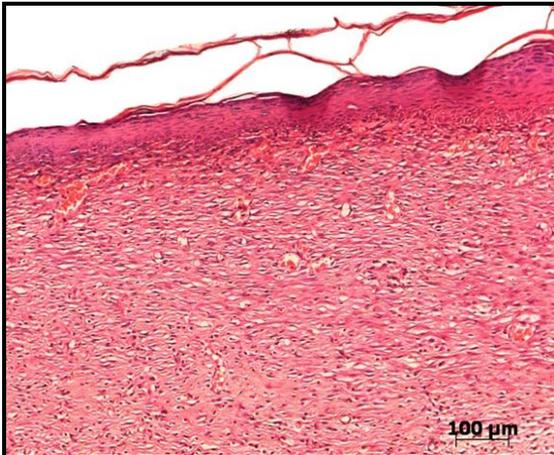


Figura 11: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).

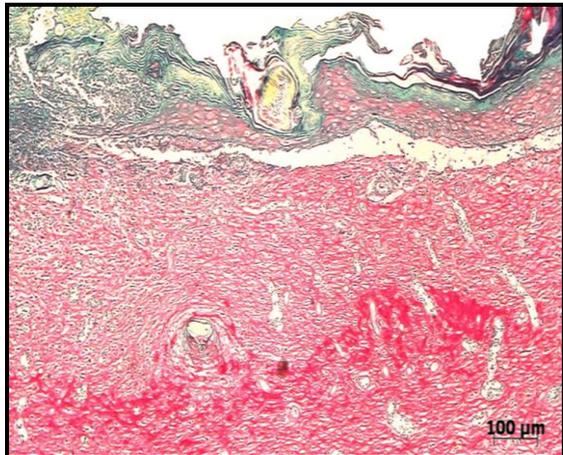


Figura 12: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).

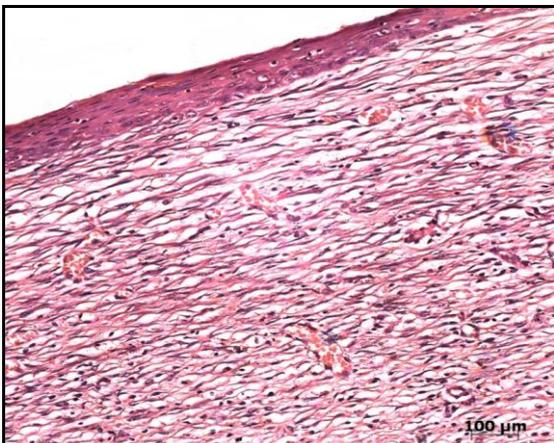


Figura 13: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório agudo discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).

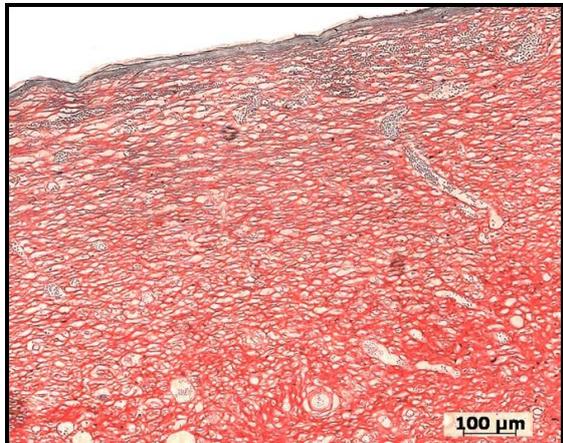


Figura 14: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).

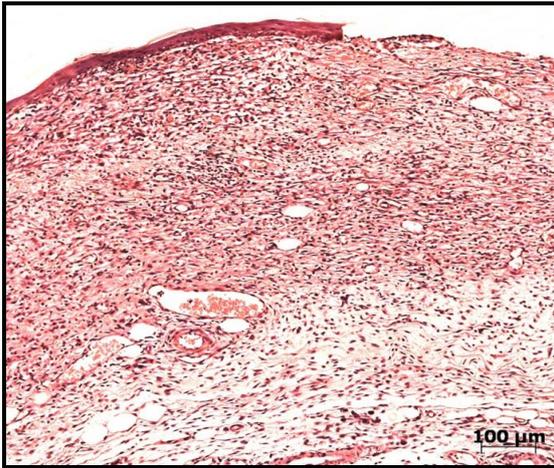


Figura 15: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização incompleta e infiltrado inflamatório crônico intenso (HE, 100X) (UFBA, 2012).

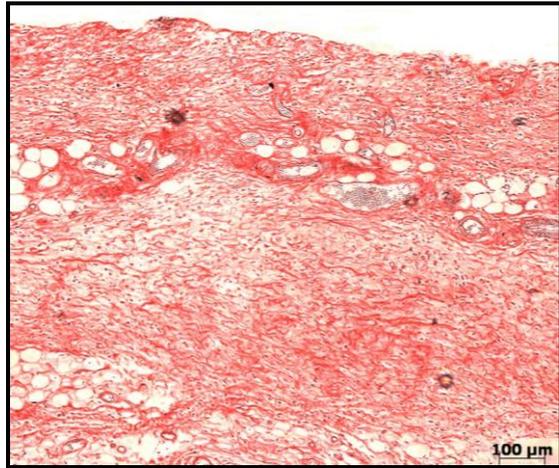


Figura 16: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno moderada e distribuição irregular (Picosirius, 100X) (UFBA, 2012).

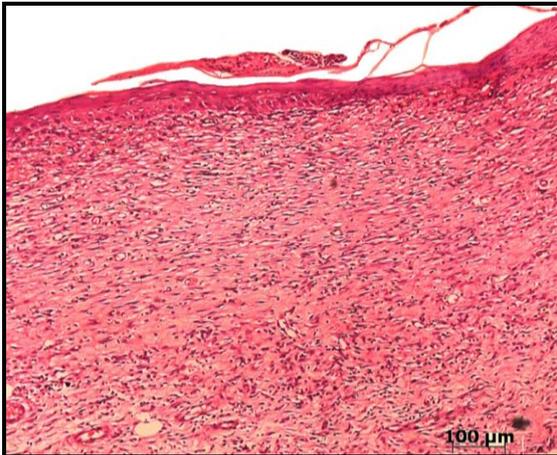


Figura 17: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico moderado (HE, 100X) (UFBA, 2012).

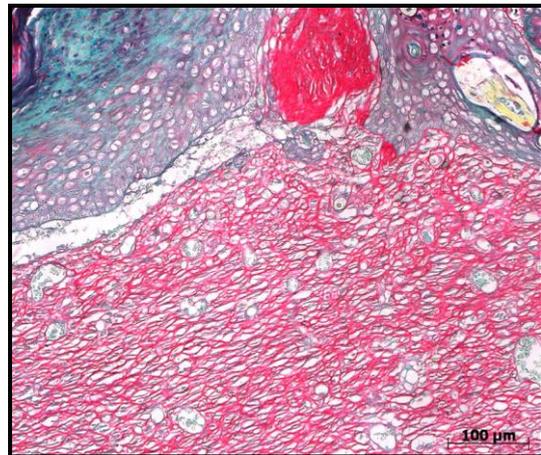


Figura 18: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias deposição de colágeno moderada e distribuição regular (Picosirius, 200X) (UFBA, 2012).

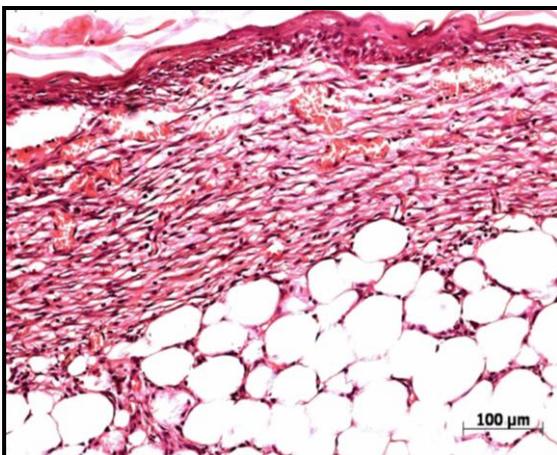


Figura 19: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico moderado (HE, 200X) (UFBA, 2012).

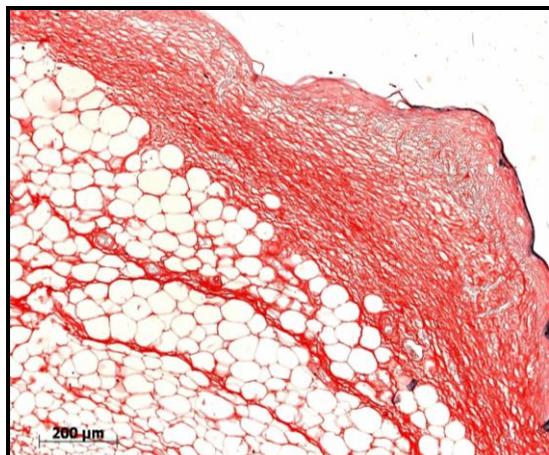


Figura 20: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando deposição de colágeno moderada e distribuição regular (Picosirius, 200X) (UFBA, 2012).

GRUPOS AVALIADOS EM 14 DIAS

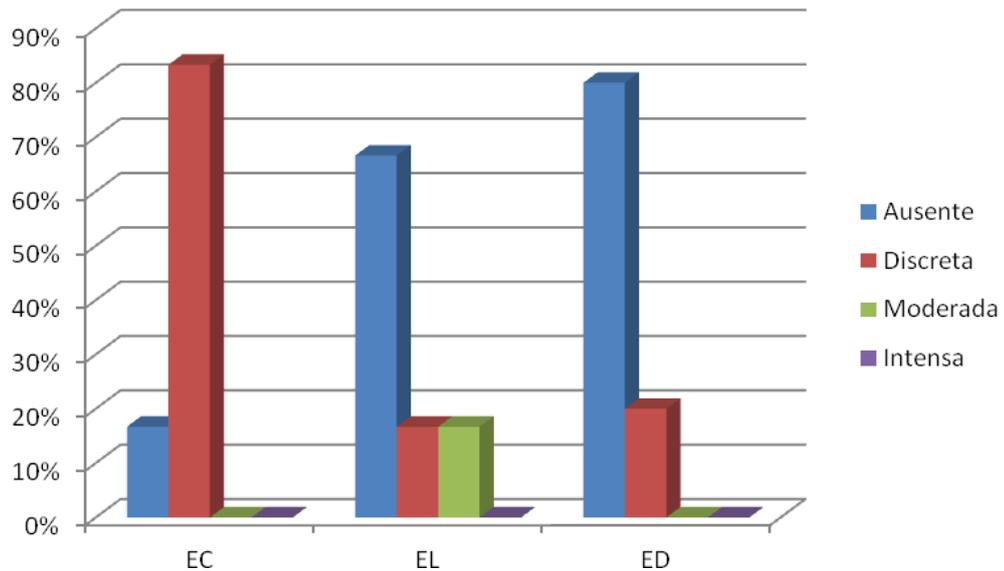
Analisando-se a reepitelização, no período experimental de 14 dias, observou-se recobrimento epitelial completo de espessura regular em todos os grupos avaliados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Figuras 26, 28, 30, 32, 34 e 36).

Quanto à presença do infiltrado inflamatório agudo e crônico, no grupo EC, verificou-se que estes se apresentaram, respectivamente, como ausente (100%) e discreto (83,3%). O infiltrado inflamatório agudo foi predominantemente ausente nos grupos irradiados EL (83,3%) e ED (100%), enquanto que o infiltrado inflamatório crônico demonstrou-se predominantemente discreto em ambos os grupos (50% e 60%, respectivamente). No grupo HC, o infiltrado inflamatório agudo foi ausente em 80% dos casos e moderado em 20%. O infiltrado crônico variou entre discreto (80%) e moderado (20%). Nos grupos hipotireoidianos irradiados, verificou-se que o infiltrado inflamatório agudo variou entre ausente (83,3%) e discreto (16,7%) no grupo HL e foi ausente em todos os casos do grupo HD. Já o infiltrado inflamatório crônico foi predominantemente moderado em ambos os grupos (66,7% e 75%, respectivamente). A análise estatística não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p>0,05$).

O tecido de granulação foi predominantemente ausente nos grupos irradiados EL (66,6%) e ED (80%) e discreto nos grupos irradiados HL (66,7%) e HD (50%). Os grupos não irradiados EC e HC apresentaram tecido de granulação discreto (83,3%) e moderado (60%), respectivamente. A angiogênese foi predominantemente discreta nos grupos irradiados EL (66,7%), ED (100%), HL (66,7%) e HD (50%), e moderada nos grupos não irradiados EC (50%) e HC (100%). A análise estatística demonstrou que a quantidade de tecido de granulação foi significativamente menor nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos irradiados, havendo diferença estatisticamente significativa apenas quando os grupos EL ($p=0,02$) e ED ($p=0,04$) foram comparados ao grupo não irradiado EC (Figura 38). A angiogênese foi significativamente menor nos grupos EL ($p=0,04$) e ED ($p=0,00$) quando comparados ao grupo EC (Figura 39), e nos grupos HL ($p=0,02$) e HD ($p=0,04$) quando confrontados a o grupo HC (Figura 40). Não houve diferença estatisticamente significativa para estas variáveis quando

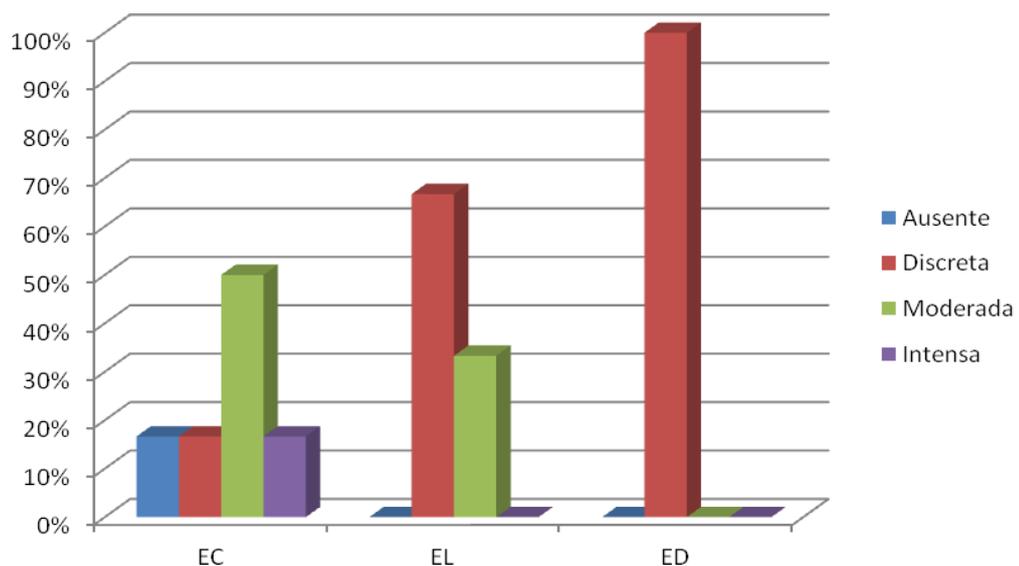
os grupos EC, EL e ED foram comparados, respectivamente, aos grupos HC, HL e HD ($p > 0,05$).

Figura 38: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à quantidade de tecido de granulação (UFBA, 2012).



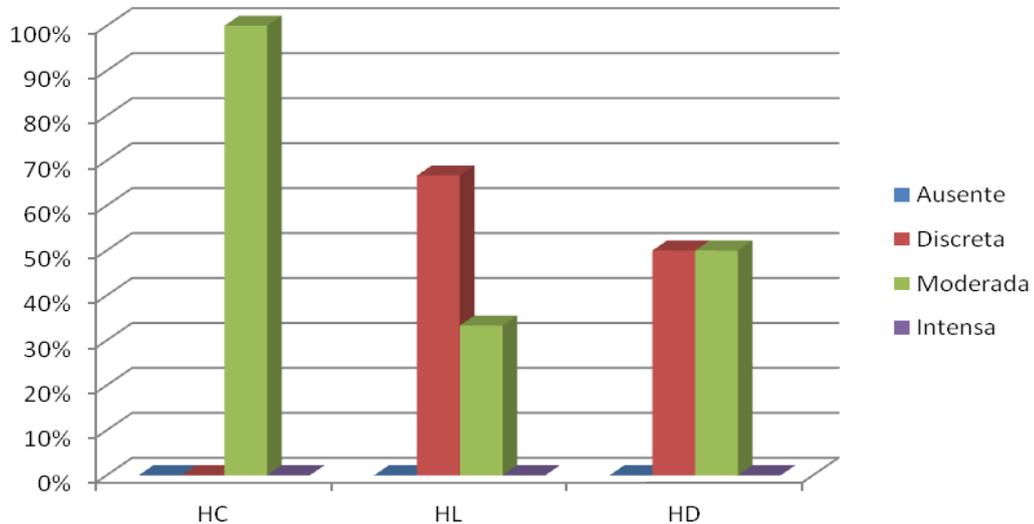
Tecido de granulação: $p=0,02$ (EC x EL); $p=0,04$ (EC x ED).

Figura 39: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à angiogênese (UFBA, 2012).



Angiogênese: $p=0,04$ (EC x EL); $p=0,00$ (EC x ED).

Figura 40: Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à angiogênese (UFBA, 2012).



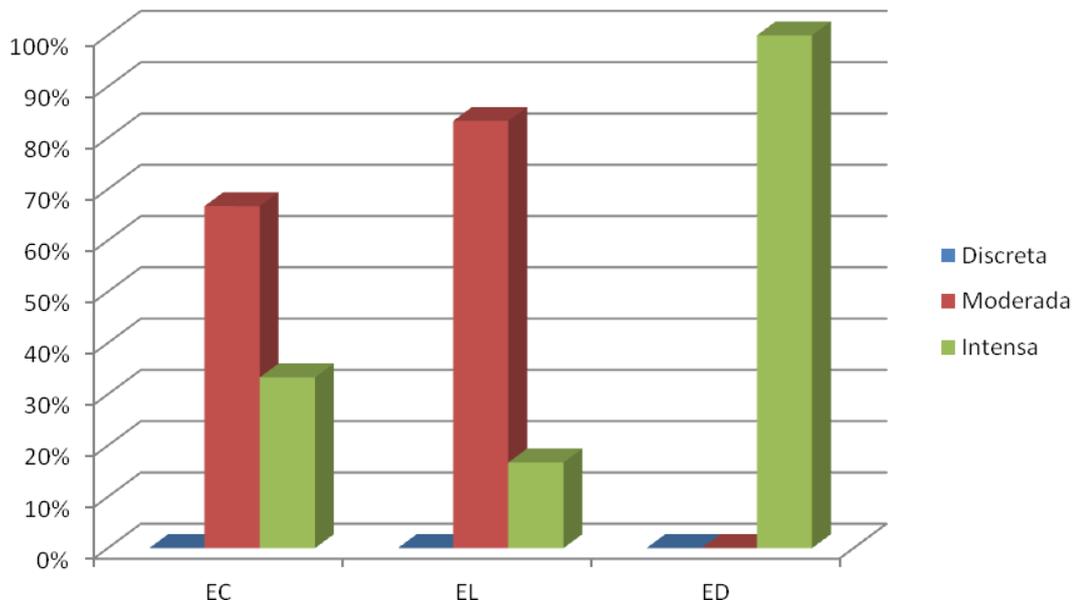
Angiogênese: $p=0,02$ (HC x HL); $p=0,04$ (HC x HD)

A quantidade de fibroblastos foi predominantemente moderada nos grupos EC (66,7%) e EL (83,3%), e intensa em todos os casos do grupo ED, cuja proliferação fibroblástica foi significativamente maior quando comparada aos grupos EL ($p=0,00$) e EC ($p=0,04$) (Figura 41). Nos grupos hipotireoidianos, a quantidade de fibroblastos foi moderada em todos os casos do grupo HC, e nos grupos HL e HD variou entre discreta (33,3% e 25%, respectivamente), moderada (50% e 50%, respectivamente) e intensa (16,7% e 25%, respectivamente). A proliferação de fibroblastos foi maior nos grupos eutireoidianos, quando confrontados com os grupos hipotireoidianos, contudo, houve diferença estatisticamente significante apenas quando o grupo ED foi comparado com os grupos HL ($p=0,00$) e HD ($p=0,03$) (Figura 42).

A deposição intensa e distribuição regular das fibras colágenas foram observadas em todos os casos dos grupos avaliados em 14 dias. A maturação colagênica foi intensa em todos os casos dos grupos irradiados (EL e ED) e predominantemente moderada no grupo EC (66,7%) (Figuras 27, 29 e 31). Nos grupos hipotireoidianos HC, HL e HD, a maturação foi predominantemente intensa (60%, 66,7% e 100%, respectivamente) (Figuras 33, 35 e 37). A análise estatística

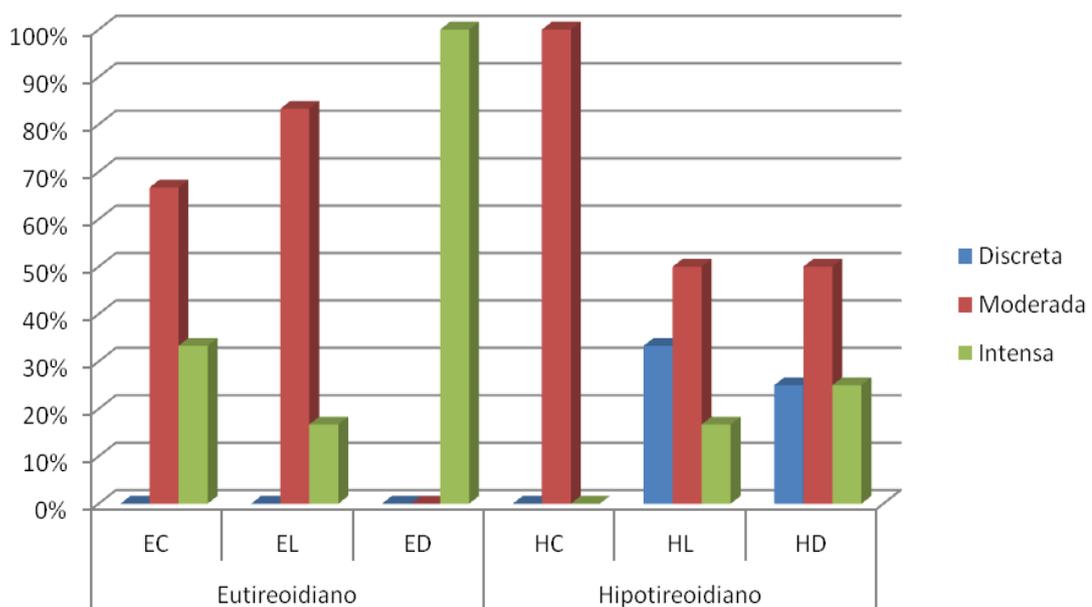
não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Figura 41: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).



Fibroblastos: $p=0,00$ (ED x EL); $p=0,04$ (ED x EC)

Figura 42: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 14 dias em relação à proliferação de fibroblastos (UFBA, 2012).



Fibroblastos: $p=0,00$ (ED x HL); $p=0,03$ (ED x HD)

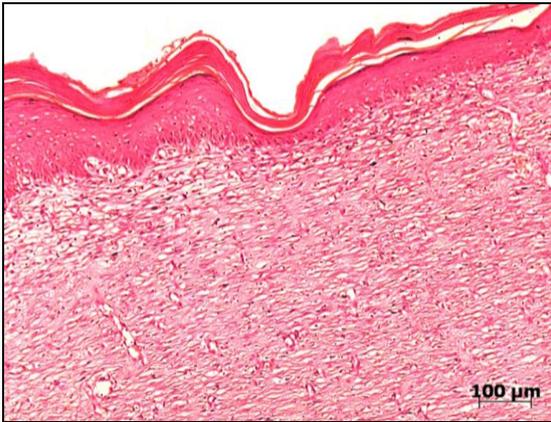


Figura 26: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico de intensidade discreta (HE, 100X) (UFBA, 2012).



Figura 27: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).

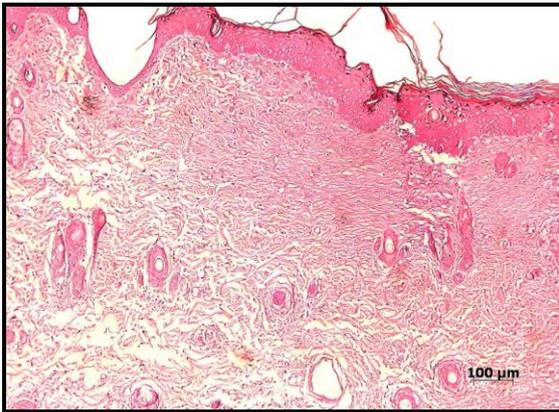


Figura 28: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório ausente (HE, 100X) (UFBA, 2012).

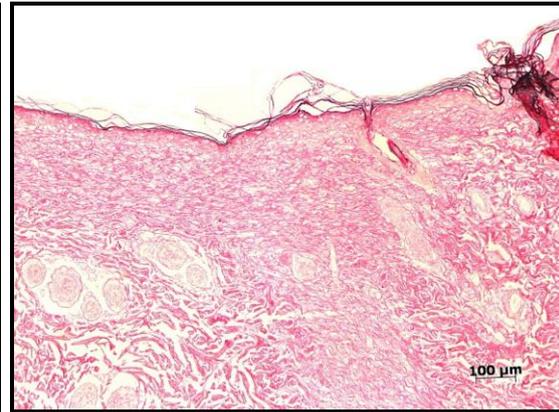


Figura 29: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).

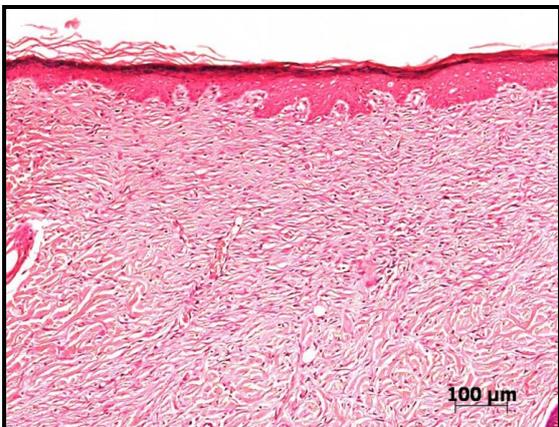


Figura 30: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório ausente (HE, 100X) (UFBA, 2012).

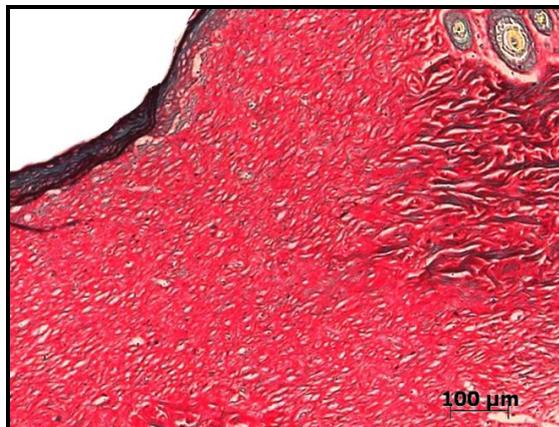


Figura 31: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picrosirius, 100X) (UFBA, 2012).



Figura 32: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).

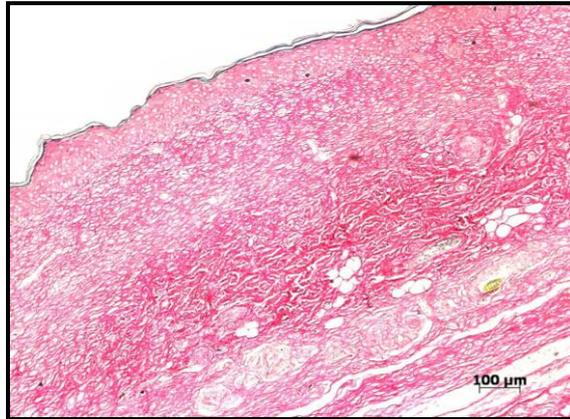


Figura 33: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picosirius, 100X) (UFBA, 2012).

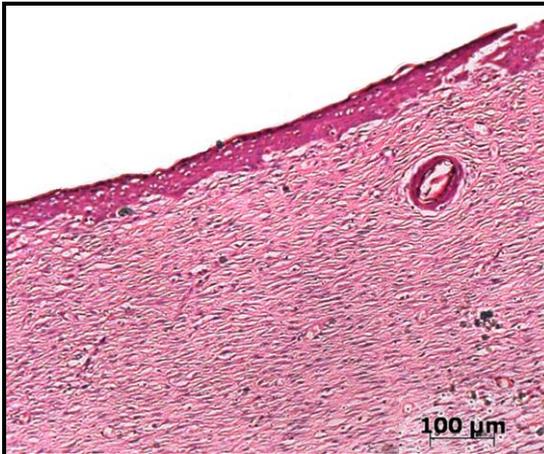


Figura 34: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico discreto (HE, 100X) (UFBA, 2012).

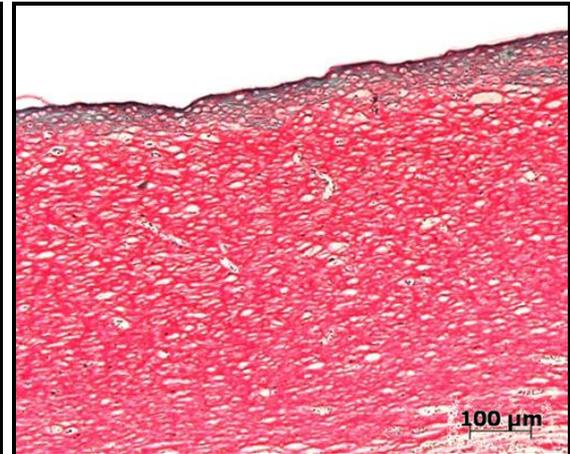


Figura 35: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picosirius, 100X) (UFBA, 2012).

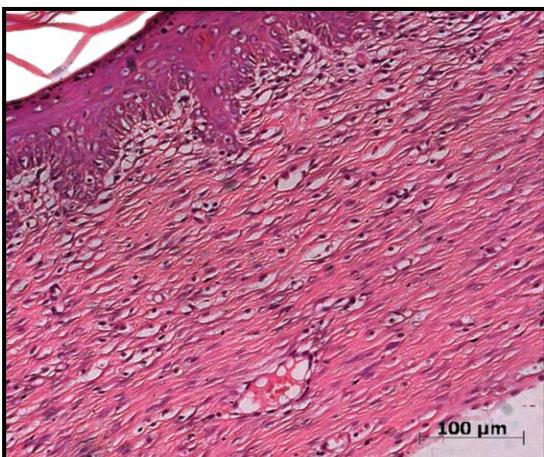


Figura 36: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando reepitelização completa e infiltrado inflamatório crônico discreto (HE, 200X) (UFBA, 2012).

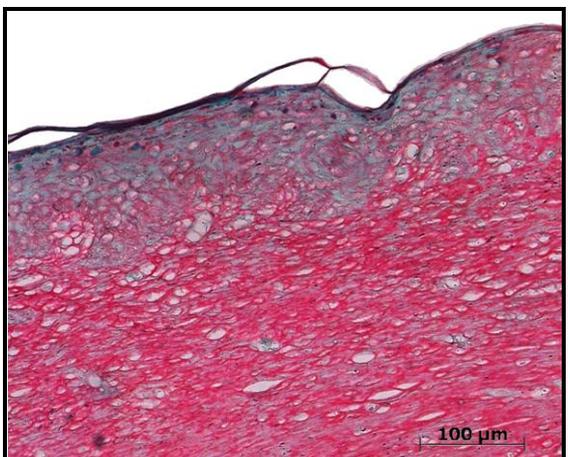


Figura 37: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando deposição de colágeno intensa e distribuição regular (Picosirius, 200X) (UFBA, 2012).

5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

GRUPOS AVALIADOS EM 7 DIAS

Nos grupos eutireoidianos EC, EL e ED a imunoexpressão do colágeno tipo I foi predominantemente discreta (100%, 60% e 60%, respectivamente), enquanto que a imunoexpressão do colágeno tipo III foi moderada em 66,7% dos casos do grupo EC, predominantemente intensa em 66,7% dos casos do grupo ED, e discreta em todos os casos do grupo EL. No grupo HC não houve imunoexpressão do colágeno tipo I em 80% dos casos, sendo considerada predominantemente discreta nos grupos HL (60%) e HD (80%) (Figuras 43 a 48).

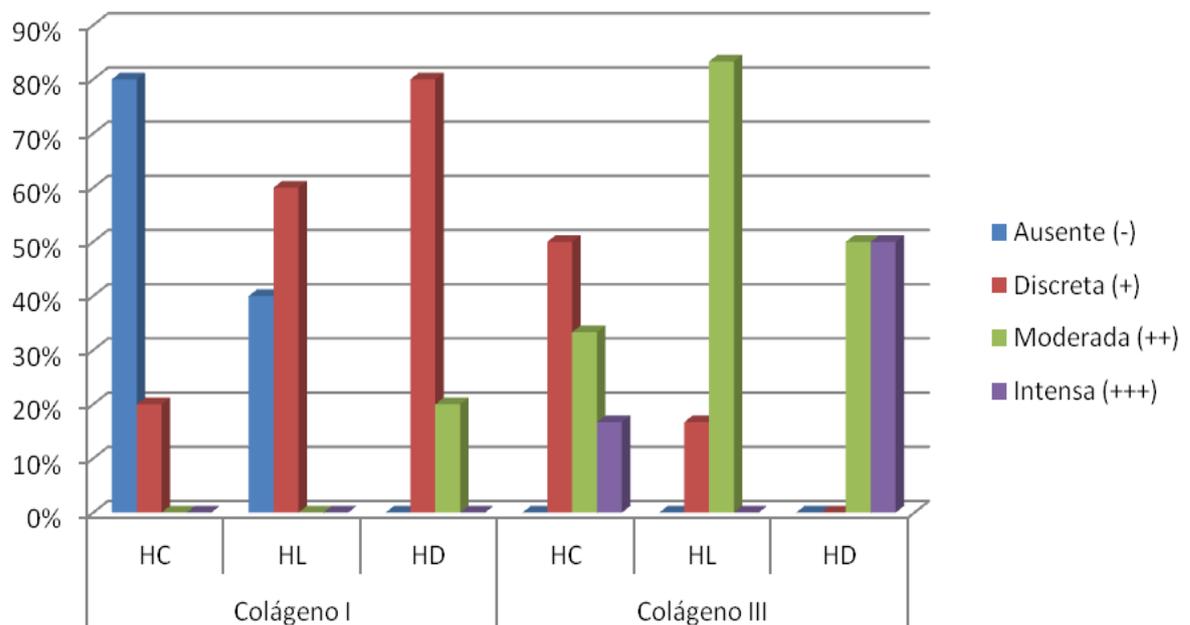
A análise estatística demonstrou maior imunoexpressão do colágeno tipo I nos grupos eutireoidianos e hipotireoidianos irradiados com Laser e LED quando comparados aos grupos não irradiados, porém, houve diferença estatisticamente significativa apenas quando o grupo HD foi confrontado com o grupo HC ($p=0,05$) (Figura 55). Quando os grupos EC, EL e ED foram comparados, respectivamente, aos grupos HC, HL e HD, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EC e HC ($p=0,019$) (Figura 56), apesar de os grupos eutireoidianos terem demonstrado maior imunoexpressão do colágeno tipo I. Não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos irradiados foram confrontados entre si na avaliação intra e intergrupo ($p>0,05$).

Nos grupos eutireoidianos, a imunoexpressão do colágeno tipo III foi predominantemente moderada no grupo EC (66,7%), discreta no grupo EL (100%) e intensa no grupo ED (66,7%). Nos grupos hipotireoidianos, variou entre discreto (50%) moderado (33,3%) e intenso (16,7%) no grupo HC. No grupo HL variou entre discreto (16,7%) e moderado (83,3%), e no grupo HD entre moderado (50%) e intenso (50%) (Figuras 49 a 54).

A análise estatística revelou que a imunoexpressão do colágeno tipo III foi significativamente maior no grupo ED, quando comparado aos grupos EC ($p=0,047$) e EL ($p=0,047$). O grupo não irradiado EC apresentou imunoexpressão do colágeno tipo III significativamente maior em relação ao grupo irradiado EL ($p=0,047$) (Figura 57). Nos grupos hipotireoidianos, observou-se que a imunoexpressão do colágeno III foi maior nos grupos irradiados HL e HD quando comparados ao grupo não irradiado HC, porém não significativa estatisticamente ($p>0,05$). Quando o grupo eutireoidiano

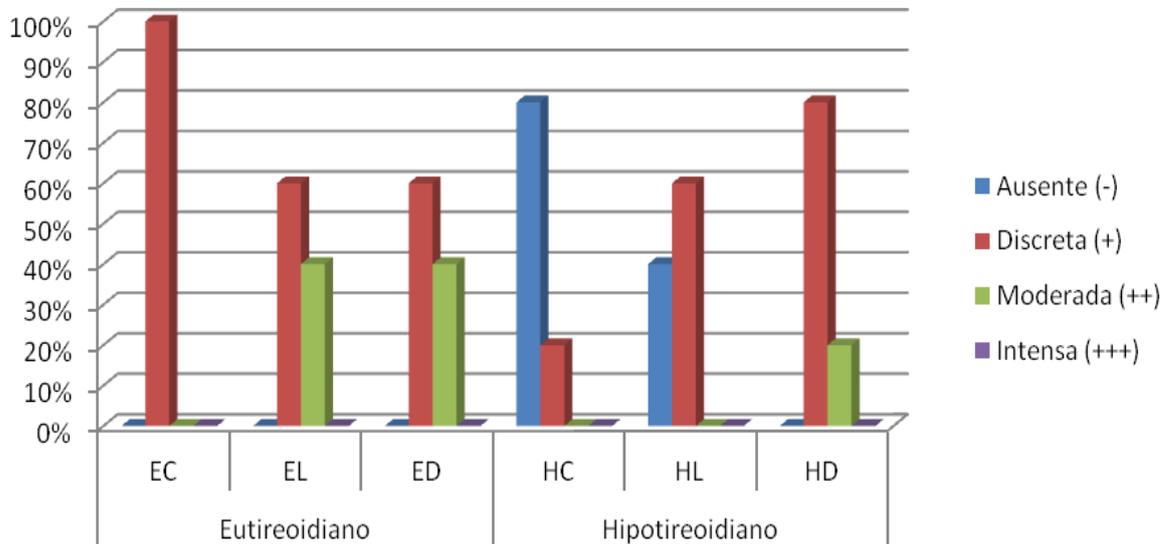
foi comparado ao hipotireoidiano, observou-se que a imunomarcação foi significativamente maior no grupo HL, quando confrontado com o grupo EL ($p=0,019$) (Figura 58). Os grupos EC e ED também apresentaram maior imunexpressão do colágeno tipo III, quando comparados, respectivamente, aos grupos HC e HD, entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre estes grupos ($p>0,05$).

Figura 55: Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunexpressão do colágeno I e colágeno III (UFBA, 2012).



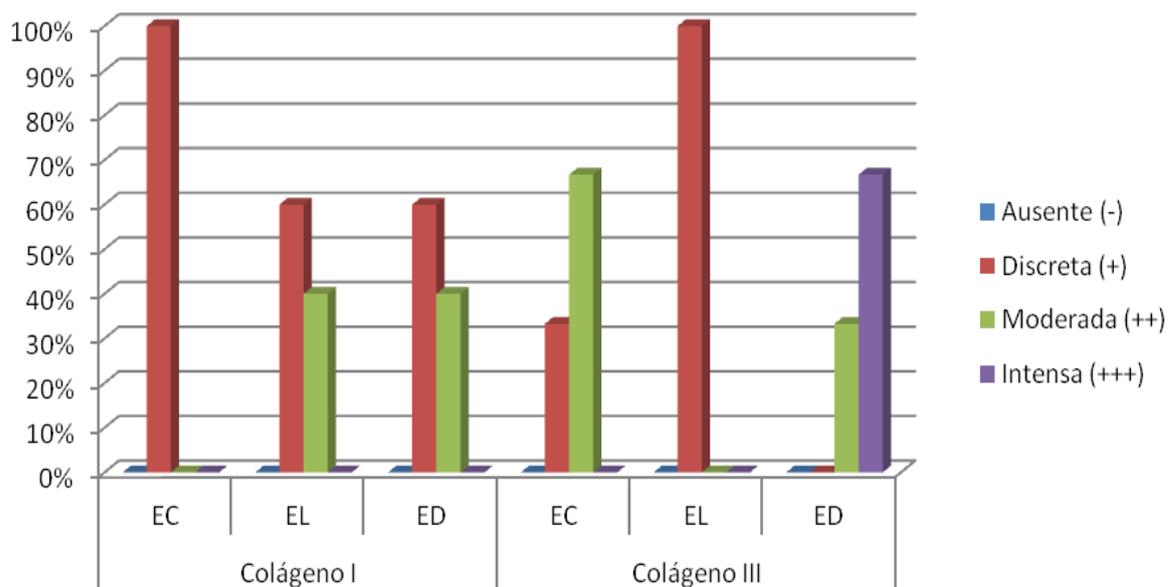
Colágeno I: $p=0,05$ (HD x HC)

Figura 56: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunexpressão do colágeno I (UFBA, 2012).



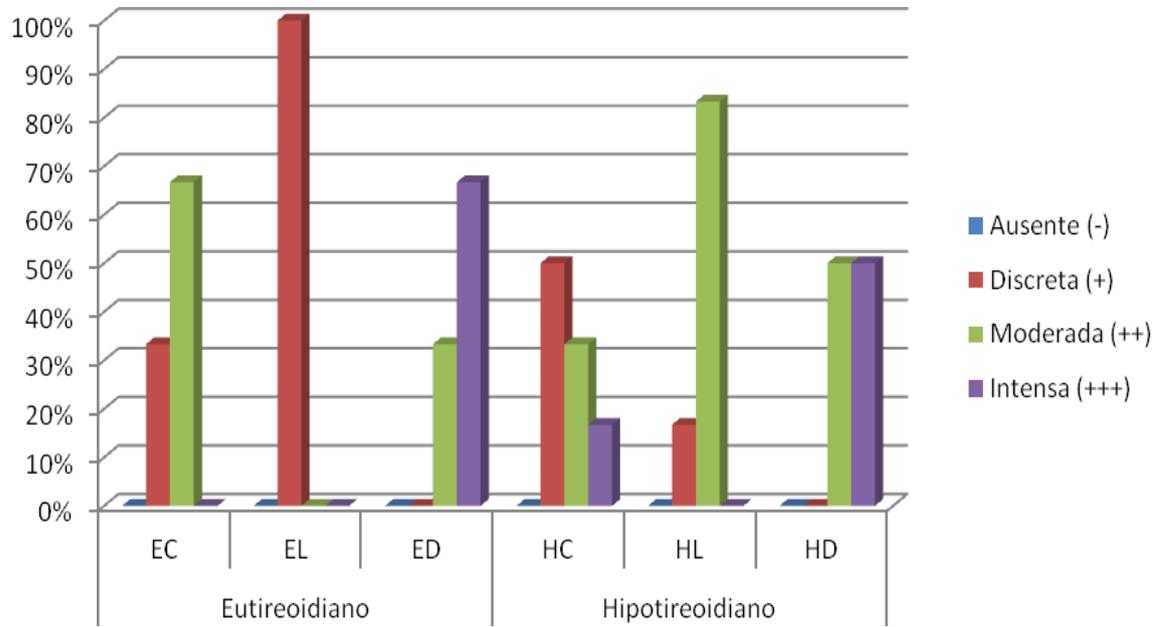
Colágeno I: $p=0,019$ (EC x HC)

Figura 57: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunexpressão do colágeno I e colágeno III (UFBA, 2012).



Colágeno III: $p=0,047$ (ED x EC); $p=0,047$ (ED x EL); $p=0,047$ (EC x EL)

Figura 58: Comparação entre os grupos Eutireoidianos e Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 dias em relação à imunexpressão do colágeno III (UFBA, 2012).



Colágeno III: $p=0,019$ (EL x HL)

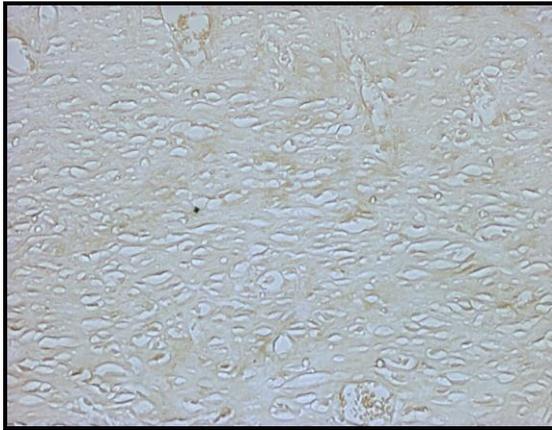


Figura 43: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

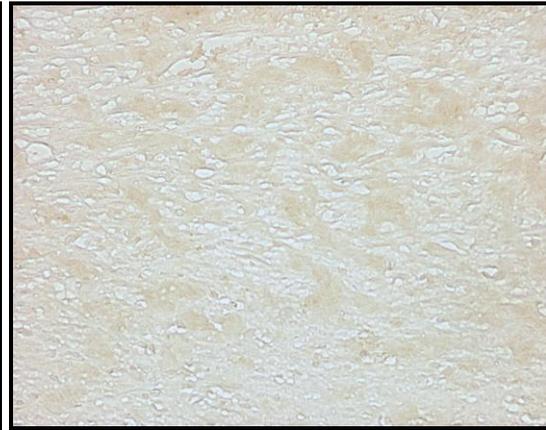


Figura 44: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

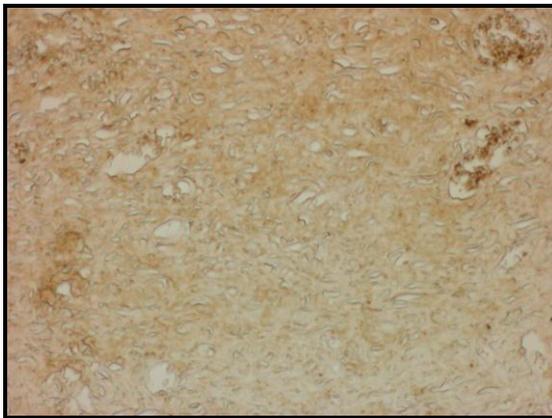


Figura 45: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).



Figura 46: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

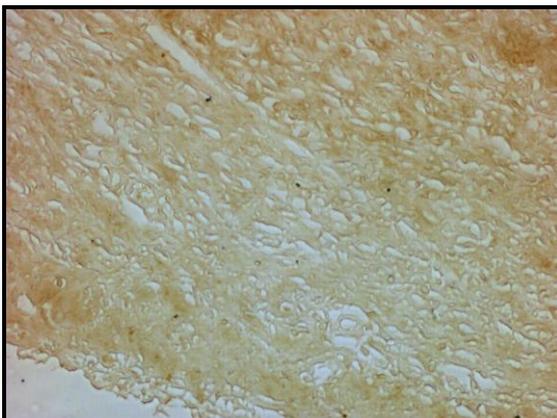


Figura 47: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

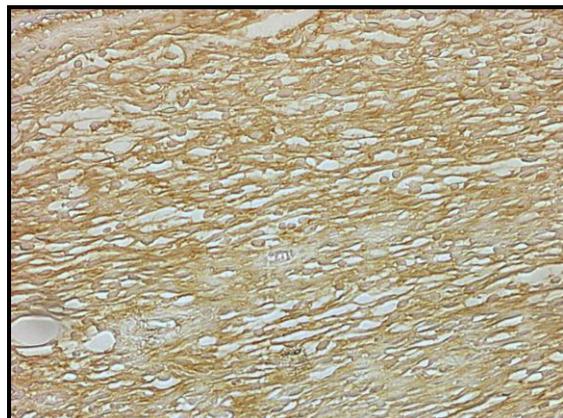


Figura 48: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

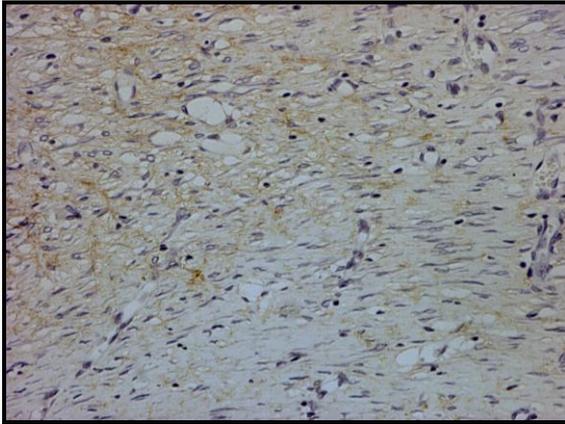


Figura 49: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

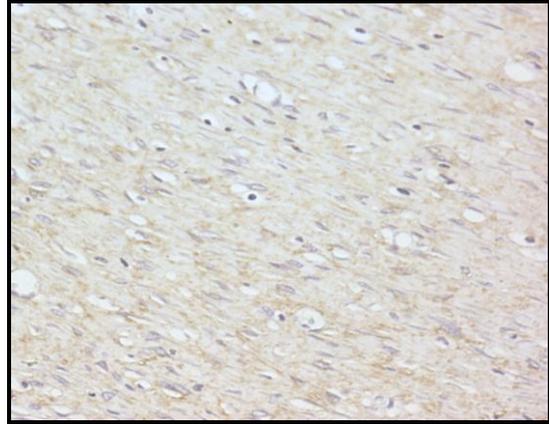


Figura 50: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

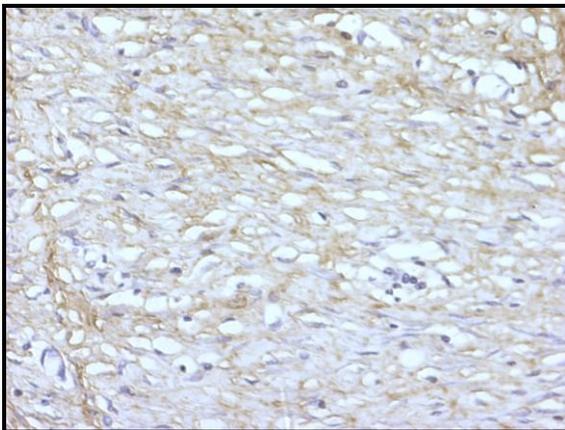


Figura 51: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

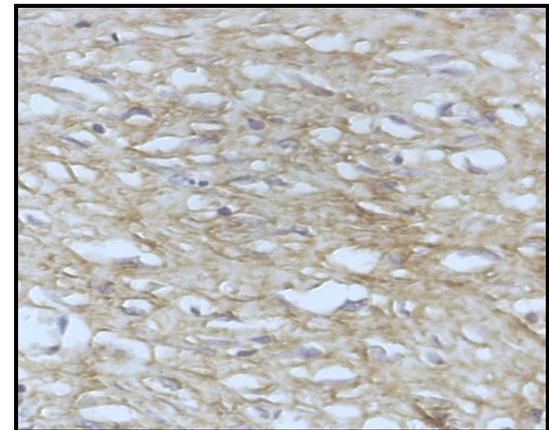


Figura 52: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão m de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

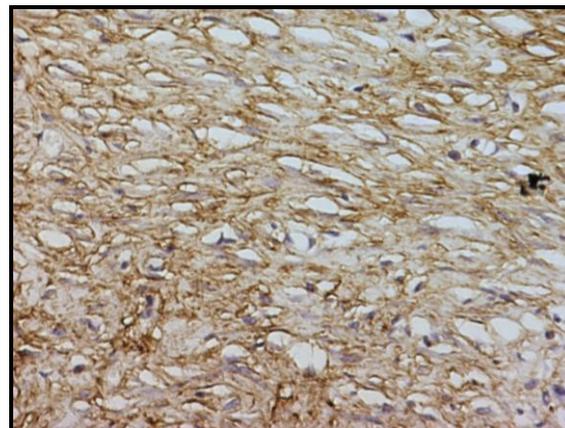


Figura 53: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

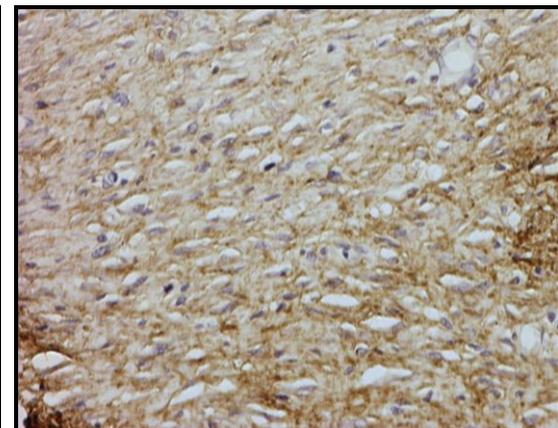


Figura 54: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 7 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

GRUPOS AVALIADOS EM 14 DIAS

No grupo eutireoidiano, a imunexpressão do colágeno tipo I foi maior nos grupos irradiados EL e ED quando comparados ao grupo não irradiado EC, que apresentaram, respectivamente, predominância de imunexpressão moderada (50%), intensa (50%) e variando entre discreta (33,3%) e moderada (66,7%) no grupo EC (Figuras 59 a 64). O mesmo foi observado em relação a imunexpressão do colágeno III que variou de discreta (16,7%), moderada (50%) e intensa (33,3%) no grupo HC. Nos grupos irradiados HL e HD, a imunexpressão do colágeno III variou entre moderada (66,7% e 50%, respectivamente) e intensa (33,3% e 50%, respectivamente) (Figuras 65 a 70).

No grupo hipotireoidiano, a imunexpressão do colágeno tipo I foi maior nos grupos irradiados HL e HD que no grupo não irradiado HC, que apresentaram, respectivamente, imunexpressão variando entre discreta (50%) e moderada (50%), e predominantemente moderada (66,7%) e discreta (66,7%) (Figuras 59 a 64). Em relação ao colágeno tipo III, houve maior tendência da imunomarcagem para o grupo HL, cuja imunexpressão variou entre discreta (16,7%), moderada (50%) e intensa (33,3%), seguido, respectivamente, da imunexpressão predominantemente moderada nos grupos HD (100%) e HC (83,3%) (Figuras 65 a 70).

A análise estatística não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).



Figura 59: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

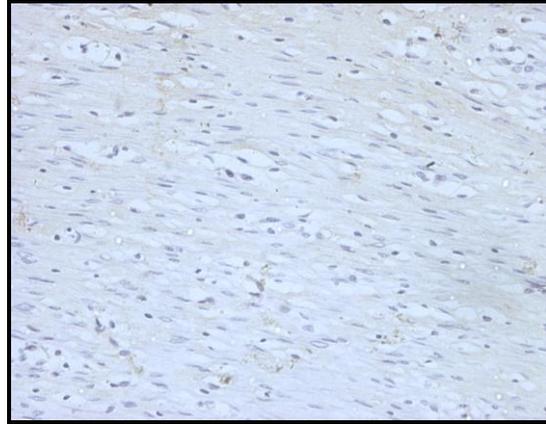


Figura 60: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

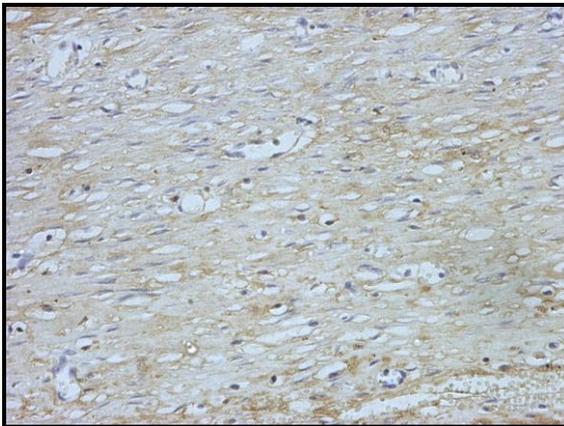


Figura 61: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

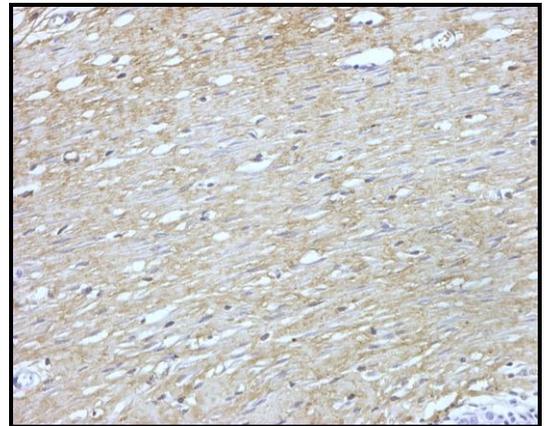


Figura 62: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

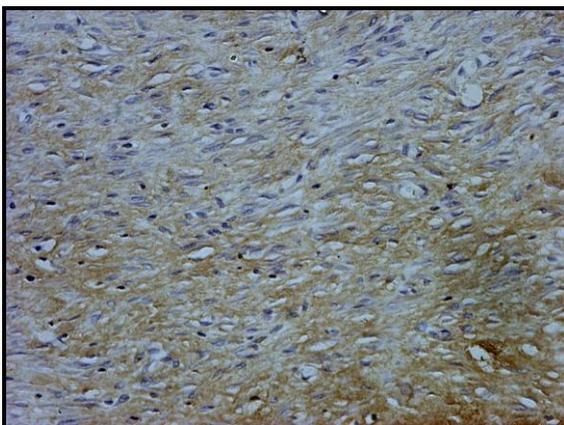


Figura 63: Fotomicrografia do Grupo LED Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

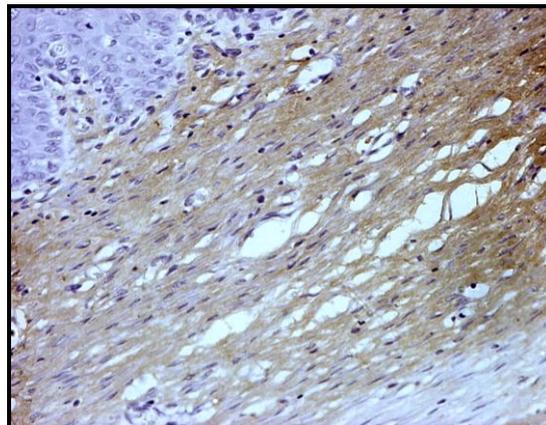


Figura 64: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno I (200X) (UFBA, 2012).

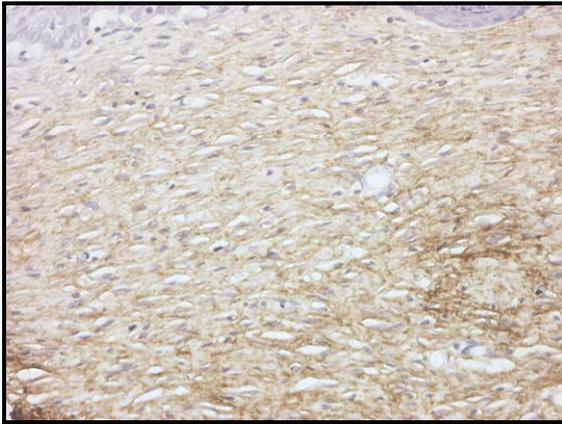


Figura 65: Fotomicrografia do Grupo Controle Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão discreta de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

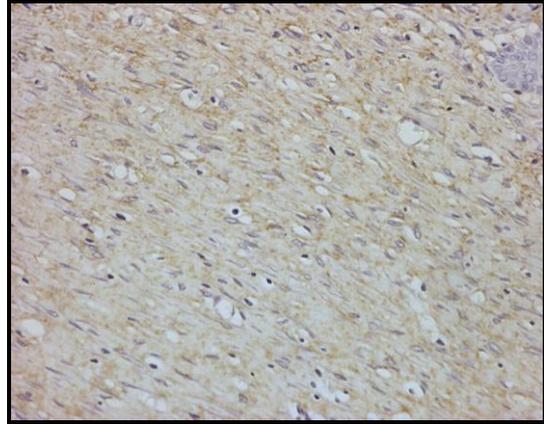


Figura 66: Fotomicrografia do Grupo Controle Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

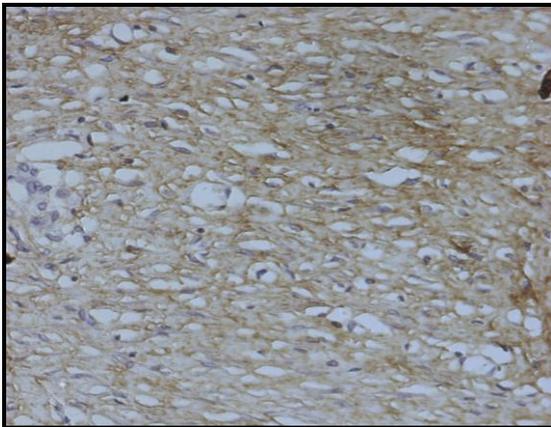


Figura 67: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

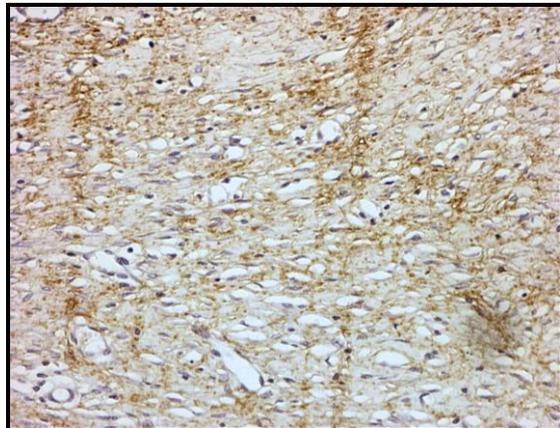


Figura 68: Fotomicrografia do Grupo Laser Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

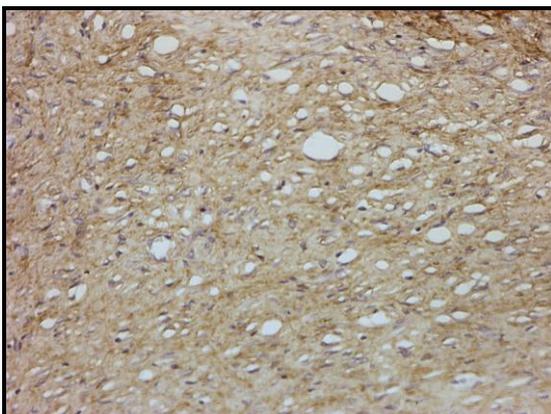


Figura 69: Fotomicrografia do Grupo Laser Eutireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão intensa de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

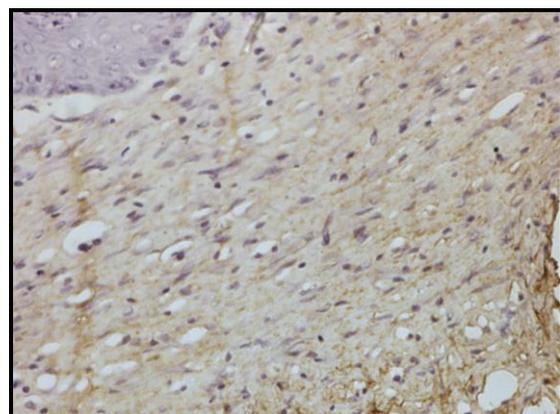
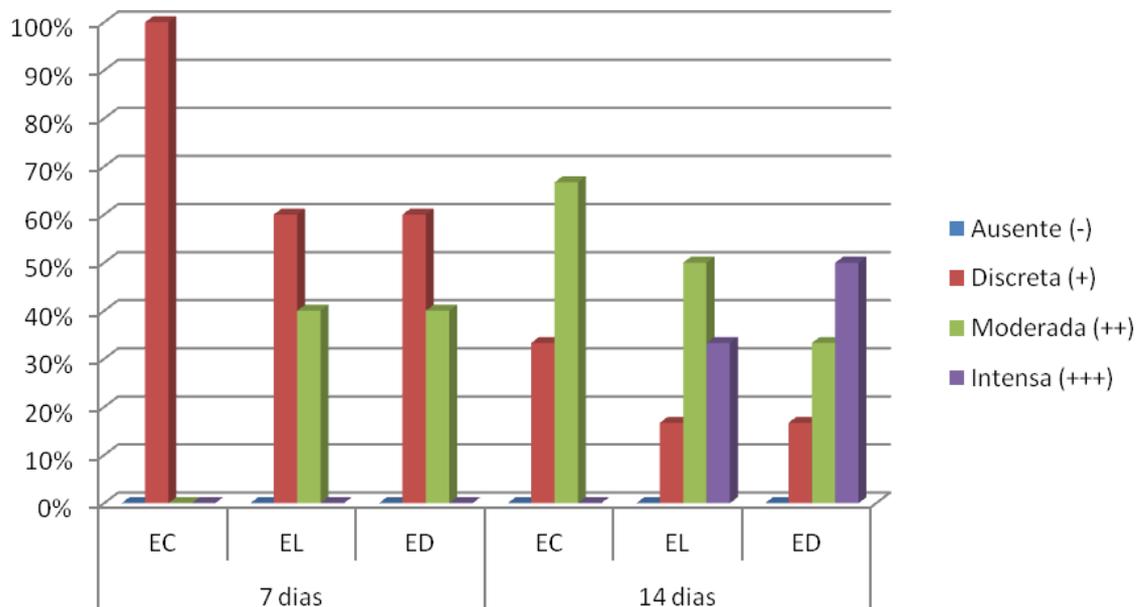


Figura 70: Fotomicrografia do Grupo LED Hipotireoidiano aos 14 dias mostrando imunoreexpressão moderada de colágeno III (200X) (UFBA, 2012).

GRUPOS AVALIADOS EM 7 E 14 DIAS

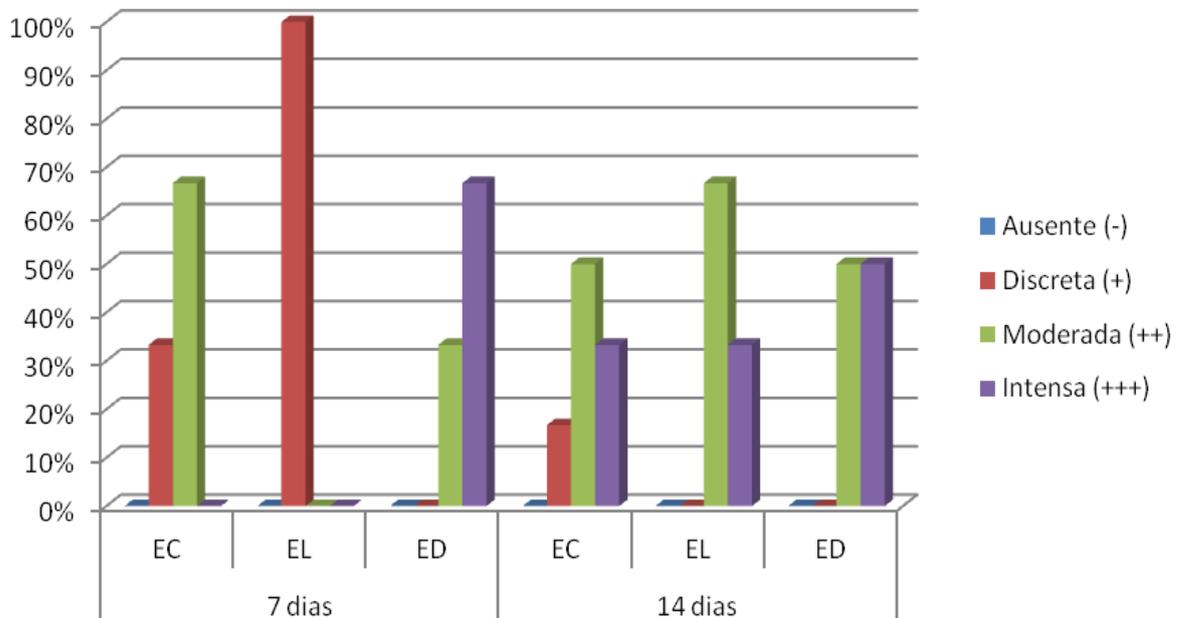
A análise estatística demonstrou que a imunoposição do colágeno tipo I nos grupos eutireoidianos avaliados no período de 14 dias foram significativamente maiores quando comparados aos mesmos grupos avaliados no período de 7 dias. Houve diferença estatística apenas quando os grupos EC ($p=0,047$), EL ($p=0,023$) e ED ($p=0,019$) avaliados em 14 dias foram comparados ao grupo EC avaliado em 7 dias (Figura 71). Em relação ao colágeno tipo III, a imunomarcção foi significativamente maior no grupo EL avaliado em 14 dias quando comparado ao mesmo grupo avaliado em 7 dias ($p=0,019$) (Figura 72). Entretanto, o grupo EC e ED apresentaram, respectivamente, maior e menor imunoposição do colágeno tipo III no período de 14 dias, quando comparados aos mesmos grupos avaliados no período de 7 dias, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 71: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoposição do colágeno I (UFBA, 2012).



Colágeno I: $p=0,047$ (EC-14 x EC-7); $p=0,023$ (EL-14 x EC-7); $p=0,019$ (ED-14 x EC-7)

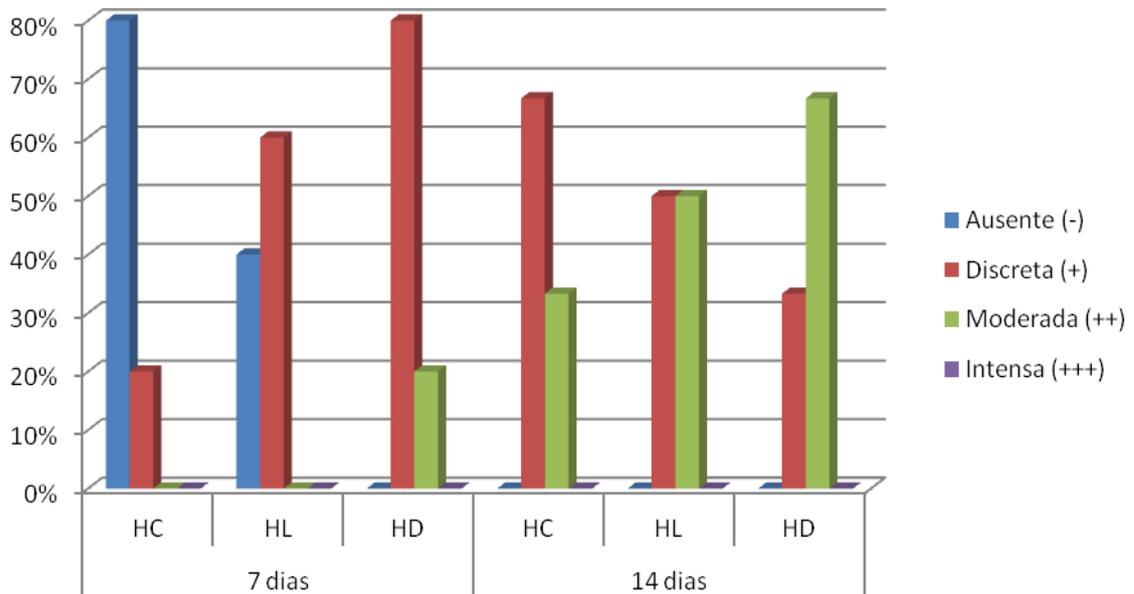
Figura 72: Comparação entre os grupos Eutireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoposição do colágeno III (UFBA, 2012).



Colágeno III: $p=0,019$ (EL-14 x EL-7)

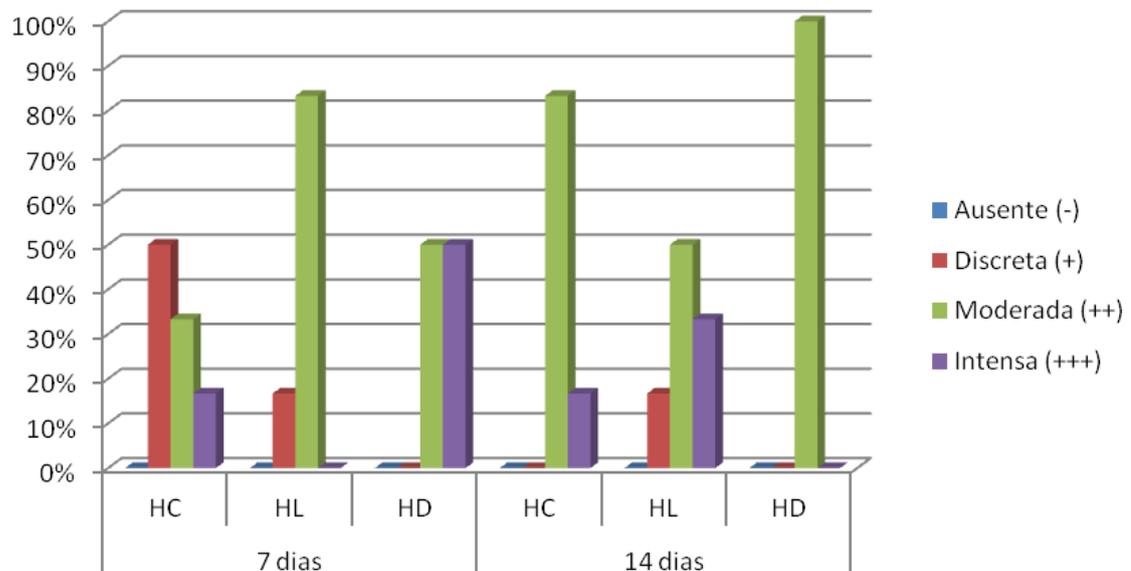
A imunoposição do colágeno tipo I foi maior nos grupos avaliados em 14 dias e houve diferença estatisticamente significativa quando o grupo não irradiado HC, avaliado em 14 dias, foi comparado aos grupos irradiados HL ($p=0,019$) e HD ($p=0,019$), avaliados em 7 dias (Figura 73). Em relação ao colágeno tipo III, a imunomarcção foi significativamente menor nos grupos irradiados HL ($p=0,019$) e HD ($p=0,019$) avaliados em 14 dias quando comparado ao grupo HD avaliado em 7 dias (Figura 74). Entretanto, os grupos HC e HL apresentaram maior, e o HD menor imunoposição do colágeno tipo III no período de 14 dias, quando comparados aos mesmo grupos avaliados no período de 7 dias, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 73: Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoposição do colágeno I (UFBA, 2012).



Colágeno I: $p=0,019$ (HC-14 x HL-7); $p=0,019$ (HC-14 x HD-7)

Figura 74: Comparação entre os grupos Hipotireoidianos Controle, Laser e LED avaliados no período experimental de 7 e 14 dias, em relação à imunoposição do colágeno III (UFBA, 2012).



Colágeno III: $p=0,019$ (HL-14 x HD-7); $p=0,019$ (HD-14 x HD-7)

6 DISCUSSAO

A utilização de ratos nesta pesquisa deve-se ao fato de a pele, na região dorsal destes animais, ser formada por epiderme, derme e tecido subcutâneo, e o processo de completa reparação na derme ocorrer de forma similar aos humanos (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003). Além disso, a ferida excisional foi escolhida para a avaliação do reparo tecidual, uma vez que tem sido respaldada na literatura como modelo experimental utilizado na determinação das taxas de cicatrização, em relação ao grau de reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese, bem como do conteúdo de fibras colágenas no tecido neoformado (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; MEDRADO et al, 2008; RIBEIRO et al, 2009).

O resultado laboratorial da dosagem do hormônio tireoidiano T_4 no grupo hipotireoidiano demonstrou valor inferior ao observado no grupo eutireoidiano, o que confirma o sucesso do método de indução ao hipotireoidismo utilizado neste estudo, proposto por Rodriguez, Ramalho e Dantas (2009) e Ramalho et al. (2010). Além disso, o acompanhamento do peso corporal dos ratos revelou a redução no percentual de crescimento no grupo hipotireoidiano, diferentemente do grupo eutireoidiano, no qual o peso corporal aumentou ao longo do período experimental, corroborando com o estudo de Ferreira et al. (2007). O desenvolvimento dos ratos hipotireoidianos é mais lento devido à redução do seu metabolismo basal/celular e menor produção de energia disponível para o seu desenvolvimento corporal (RODRIGUEZ; RAMALHO; DANTAS, 2009). Além disso, durante este estudo, foi observada a redução na ingestão de alimentos pelos ratos hipotireoidianos. Desta forma, a perda de peso corporal já era esperada nesse grupo devido à diminuição plasmática do hormônio tireoidiano, responsável pelo metabolismo do organismo.

O retardo no processo de cicatrização de feridas associado ao hipotireoidismo também foi verificado no presente estudo, demonstrando a interferência dessa condição sistêmica no reparo tecidual conforme observado por Biondo Simões et al. (2005) e Zimmerman et al. (2009). No entanto, a literatura carece de modelos experimentais que avaliem o processo de cicatrização de feridas cutâneas associado à deficiência de hormônios tireoidianos.

Sabe-se que a cicatrização por segunda intenção requer maior tempo de reparo, já que a aproximação entre as bordas é mais demorada, e que algumas condições sistêmicas, como o hipotireoidismo, podem retardar ainda mais o

processo, interferindo principalmente na deposição e organização das fibras colágenas (BIONDO-SIMÕES et al, 2005a; BIONDO-SIMÕES et al, 2005b). No intuito de dificultar o processo de reparo das feridas cutâneas excisionais, não houve reposição hormonal no grupo experimental induzido ao hipotireoidismo, simulando situações nas quais não há acesso a tratamento, seja por motivos financeiros ou por desconhecimento da patologia. Deste modo, este estudo foi realizado para avaliar os efeitos das fototerapias Laser e LED em modelo experimental de feridas excisionais confeccionadas em dorso de ratos hipotireoidianos.

A dificuldade de cicatrização espontânea, principalmente em casos de lesões cutâneas crônicas associadas a fatores que interferem no processo de reparo, como disfunções sistêmicas, justificam a utilização de recursos terapêuticos que possam acelerá-la. As fototerapias Laser e LED constituem alguns desses recursos, uma vez que promovem efeitos biomoduladores positivos desde a fase inflamatória aguda até a fase de remodelagem da cicatriz. Todavia, a luz LED ainda possui restrita base literária, na qual são questionados os efeitos positivos e similares à luz Laser.

A literatura tem demonstrado a eficácia das fototerapias Laser e LED na aceleração do reparo tecidual (CORAZZA et al, 2007; MEDRADO et al, 2010; RIBEIRO et al, 2009; DE SOUSA et al, 2010; DE SOUSA et al, 2011), no entanto, são limitados os estudos que avaliam a associação com o comprometimento sistêmico, como diabetes, desnutrição e anemia (AL-WATBAN, 2009; CARVALHO et al, 2006; RABELO et al, 2006; DALL AGNOL et al, 2009; MEIRELES et al, 2008; PINHEIRO et al, 2009; RAMALHO et al., 2010), não existindo consenso quanto ao melhor protocolo de irradiação a ser estabelecido. Além disso, na literatura consultada, não foram observados estudos que associassem a utilização dessas fontes de luz ao hipotireoidismo, outra condição sistêmica com influência no reparo tecidual.

O protocolo de irradiação do presente estudo foi iniciado imediatamente após a confecção da ferida, conforme sugerido pela literatura (FERREIRA et al, 2008; MARCHIONNI et al, 2010; PINHEIRO et al, 2009; RAMALHO et al., 2010; DE SOUSA et al, 2010; DE SOUSA et al, 2011), no intuito de interferir já nos estágios iniciais do processo de reparação, desde a fase inflamatória aguda (FERREIRA et al, 2008). O período estabelecido para avaliação foi de sete e 14 dias, assim como observado em alguns estudos (BUSNARDO e BIONDO-SIMÕES, 2010; CORAZZA et al, 2007; CARVALHO et al, 2006; RAMALHO et al., 2010), pois as diferenças

entre os grupos irradiados e não irradiados, bem como grande parte dos eventos que acompanham as fases do processo de reparação cutânea se concentra nestes períodos, sendo possível avaliar a ocorrência de diferenças quanto à organização do tecido neoformado entre os grupos (BORGGO, 2010). Entretanto, períodos experimentais menores também têm sido utilizados (BUSNARDO e BIONDO-SIMÕES, 2010; MEDRADO et al, 2008; MEDRADO et al, 2010), sendo adequados principalmente para a avaliação dos estágios iniciais como o processo inflamatório (VIEGAS et al, 2007).

A escolha da dose ideal também consiste em um grande desafio. Tuner e Hode (2004) consideram que a densidade de energia ideal varia de 1 a 4 J/cm² por ponto, e que doses mais elevadas podem exercer efeito inibidor sobre o processo de cicatrização. No entanto, em estudos que avaliem o reparo associado a alguma disfunção sistêmica, doses mais elevadas têm sido utilizadas (PINHEIRO et al. 2009; PINHEIRO et al, 2004; PINHEIRO et al, 2005; RAMALHO et al., 2010). Nos estudos de Pinheiro et al. (2004) e Pinheiro et al. (2009), a utilização da fototerapia Laser (λ 635nm) ajustada a 20J/cm² e 40J/cm² na cicatrização tecidual em ratos nutridos e desnutridos, demonstraram melhores resultados quando o Laser ajustado à dose de 20 J/cm² foi utilizado, principalmente no grupo desnutrido. Do mesmo modo, Meireles et al. (2008) observaram resultado similar quando o Laser (λ 660nm) ajustado a 20J/cm² foi utilizado no reparo tecidual em ratos diabéticos.

Sabe-se que a difusão e dispersão da luz dos Lasers e LEDs não ocorrem da mesma maneira ao penetrar nos tecidos biológicos (ENWEMEKA, 2006). No entanto, alguns estudos evidenciam que a luz coerente e não coerente, com densidade de energia, intensidade e comprimento de onda idênticos, fornecem a mesma resposta biológica (WHELAN et al, 2002; WHELAN et al, 2001).

A coerência foi utilizada por alguns autores para justificar maior eficiência do Laser em relação ao LED (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006; HODE, 2005). Para Hode (2005), a coerência não desaparece, mas se reduz ao longo da penetração do tecido, exercendo ainda influência na área irradiada. Contudo, para outros autores, quando se trata de tecido biológico, esta coerência é perdida nas primeiras camadas dos tecidos (WOLLMANN e NICOLAU, 2009; VINCK et al, 2003) devido ao fenômeno de dispersão da luz, antes que se produza a absorção dos fótons por cromóforos como a melanina, hemoglobina, porfirinas e citocromo oxidase (VINCK et

al, 2003). Dessa forma, a coerência da luz não parece ser a propriedade mais importante para o efeito fotobioestimulador no tecido como se imaginava (CORAZZA et al, 2007).

No presente estudo, com a aproximação do comprimento de onda e similaridade das doses de energia, não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis avaliadas. Quando os grupos irradiados com Laser foram comparados aos irradiados com LED observou-se similaridade de resultados em relação à fotobiomodulação do reparo tecidual, apresentando efeitos satisfatórios no estímulo da reepitelização, proliferação de fibroblastos, deposição e distribuição colagênica. Tais resultados corroboram com os estudos encontrados na literatura, que tem demonstrado efeitos similares na fotobiomodulação tecidual quando comparado o uso da fototerapia de luz coerente e não coerente (PINHEIRO et al, 2006; WHELAN et al, 2001; PINHEIRO et al, 2004). No estudo realizado por Dall Agnol et al. (2009), ao comparar o uso das fototerapias Laser ($\lambda 660$ nm) e LED ($\lambda 640$) no reparo tecidual em ratos diabéticos, também foi observado que ambas as luzes produziram efeitos semelhantes na cicatrização de feridas.

Vale ainda ressaltar que a comparação entre os grupos hipotireoidianos e eutireoidianos irradiados com a mesma fonte de luz não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, demonstrando que a fototerapia foi capaz de melhorar o processo de cicatrização de modo similar em ambos os grupos, mesmo na presença do hipotireoidismo.

Alguns autores acreditam que os efeitos biológicos do Laser de baixa potência dependem principalmente de sua monocromaticidade (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; PINHEIRO, 2009) e da densidade de energia, assim como da fase de crescimento celular em que as células receberam a irradiação (KARU, 2003). Diante dos resultados observados neste estudo, é possível concordar que a coerência e colimação não são fatores decisivos para induzir alterações nas funções celulares, e sim a banda de absorção do espectro eletromagnético conforme observado por Corazza et al. (2007), visto que todos os grupos irradiados utilizaram a luz no comprimento de onda vermelho.

As fontes de luz Laser e LED produzem banda espectral relativamente estreita, contudo, o espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo (DALL AGNOLL et al, 2009; AL-WATBAN e ANDRES, 2003; WHELAN et al, 2003; VINCK et al, 2003), e podem ainda ser configurados para produzir

múltiplos comprimentos de onda (WHELAN et al, 2002). Conforme supracitado, o que diferencia basicamente o LED do Laser é o fato de não ser uma luz colimada nem coerente, apresentando divergência, que por um lado constitui uma desvantagem, pois os fótons se repartem em uma superfície maior, por outro lado, representa uma vantagem, já que permite cobrir áreas maiores, sem ter que fazer movimentos (MEYER et al, 2010; WHELAN et al, 2003; VINCK et al, 2003). Além disso, o LED possibilita a interação com maior grupo de fotorreceptores específicos, já que a energia está distribuída em banda espectral maior, o que permite ampla janela biológica de absorção da luz pelos tecidos, permitindo a ação terapêutica nos respectivos fotorreceptores (CORAZZA, 2005).

A fase proliferativa do processo de reparo se inicia por volta do terceiro dia após a lesão e persiste por duas a três semanas resultando na neoangiogênese, produção de colágeno pelos fibroblastos, reepitelização e contração da ferida (FERREIRA et al, 2008). Entretanto, apesar de neste estudo os grupos irradiados terem demonstrado melhores resultados em relação à reepitelização e deposição de fibras colágenas, observou-se que a angiogênese foi maior nos grupos não irradiados, demonstrando diferenças estatisticamente significantes apenas em relação aos grupos controles avaliados em 14 dias, que persistiram em fase vascular, o que difere do resultado observado no estudo de Melo et al. (2011), no qual a angiogênese no tecido neoformado foi significativamente maior nos grupos irradiados com Laser, tanto no período de 7 quanto de 14 dias, quando comparados aos respectivos controles. Ao compararem os efeitos angiogênicos do Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e do LED ($\lambda 635\text{nm}$), ajustados às densidades de energia de 5 e $20\text{J}/\text{cm}^2$, nos períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias, Corazza et al. (2007) também observaram que a angiogênese foi superior em todos os grupos irradiados, no entanto a ação angiogênica foi significativamente maior no 3º dia com destaque para a fototerapia LED a $5\text{J}/\text{cm}^2$, apesar de não existir diferença estatisticamente significativa quando os grupos irradiados foram comparados entre si.

As fototerapias promoveram repavimentação epitelial mais evidente nos grupos irradiados avaliados em sete dias, tanto no grupo eutireoidiano quanto no hipotireoidiano. Já em 14 dias, observou-se comportamento homogêneo em todos os grupos para esta variável. Neste período, as diferenças entre os grupos não foram significativas já que todos os animais apresentaram reepitelização completa da ferida, demonstrando que os estágios iniciais são mais importantes para

determinar os efeitos do tratamento oferecido, porque há um ponto no qual as feridas de todos os grupos serão fechadas, conforme observado por Whelan et al. (2001).

A contração da cicatriz está associada a forças celulares e elementos contráteis de fibroblastos, os miofibroblastos, que aparecem na ferida já no final da primeira e começo da segunda semana, constituindo o principal mecanismo de oclusão da ferida (FERREIRA et al, 2008). Recentes estudos encontrados na literatura confirmam a atuação destes tipos celulares durante o processo de contração tecidual. Marchionni et al. (2010), Medrado et al. (2003), Medrado et al. (2008), Medrado et al. (2010) e Ribeiro et al. (2009) observaram, através da análise imuno-histoquímica para miofibroblastos, que houve grande proliferação destas células, principalmente nos ratos submetidos à fototerapia Laser. Entretanto, ainda são restritos os estudos que avaliam imuno-histoquimicamente a expressão destas e de outras proteínas importantes no processo de cicatrização de feridas associada ao uso das fototerapias Laser ou LED.

No que se refere ao infiltrado inflamatório, observou-se no presente estudo, que a inflamação aguda foi maior nos grupos irradiados no período de 7 dias, já o percentual de infiltrado inflamatório crônico foi inferior. Este resultado demonstra os efeitos fotobiomoduladores no processo inflamatório, uma vez que tem sido sugerido que inicialmente ocorre aumento das células inflamatórias no local de lesão, para remover rapidamente o excesso de detritos celulares, e conseqüentemente reduzir o número das células inflamatórias, dinamizando a sua funcionalidade na produção de fatores de crescimento e acelerando os eventos biológicos da inflamação (WHELAN et al, 2001). Nos grupos irradiados avaliados em 14 dias, observou-se predominantemente a ausência de infiltrado inflamatório agudo e infiltrado inflamatório crônico mais discreto, caracterizando o estágio mais avançado deste processo. Este resultado corrobora com a literatura, uma vez que no décimo quarto dia do experimento a reação inflamatória é composta predominantemente por células mononucleares (BORGIO, 2010). Entretanto, Melo et al. (2011) observaram em seu estudo que o grupo irradiado apresentou padrão linfoplasmocitário do infiltrado inflamatório já no período de 7 dias, enquanto que nos grupos avaliados em 14 dias, observou-se que os grupos irradiados e não irradiados apresentaram a mesma caracterização do processo inflamatório, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Os grupos eutireoidianos irradiados com Laser ou LED e avaliados em 7 dias apresentaram tendência a maior formação de tecido de granulação, indicando influência positiva destas fototerapias sobre a fase proliferativa do reparo, diferentemente do grupo hipotireoidiano, no qual o grupo controle apresentou maior quantidade de tecido de granulação. Já no período de 14 dias observou-se que os grupos eutireoidianos irradiados apresentaram significativamente menor quantidade de tecido de granulação, demonstrando que o tecido neoformado já se encontrava na fase de remodelação tecidual, como maior proliferação fibroblástica. O mesmo se observou nos grupos hipotireoidianos irradiados.

Neste estudo foi possível observar que a maturação e deposição colagênica foram inferiores no grupo hipotireoidiano controle, quando comparado ao grupo eutireoidiano controle, bem como nos grupos não irradiados quando comparados aos grupos irradiados com as luzes Laser ou LED. Contudo, esta tendência não foi suficiente para denotar significância estatística. Porém, quanto à distribuição das fibras colágenas nos tecidos, verificou-se um padrão de distribuição mais organizado nos grupos irradiados e nos grupos eutireoidianos, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado aos grupos não irradiados e hipotireoidianos, respectivamente, melhorando a qualidade e integridade do tecido neoformado.

As irradiações com Laser ou LED, apesar de promoverem maior grau de maturação, deposição e distribuição de fibras colágenas no período de sete dias, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. No entanto, os grupos eutireoidianos irradiados demonstraram maior grau de maturação e deposição colagênica, sendo que no grupo hipotireoidiano, apenas o grupo irradiado com a luz LED demonstrou resultados similares para estas variáveis. Quanto ao padrão de organização das fibras colágenas, ambas as fontes de luz demonstraram efeitos positivos em sua distribuição, tanto no grupo eutireoidiano quanto no hipotireoidiano, havendo diferença estatisticamente significativa apenas quando os grupos eutireoidianos, irradiados ou não, foram comparados com o grupo hipotireoidiano controle, o que demonstra que as fototerapias Laser e LED foram capazes de promover organização colagênica no grupo hipotireoidiano de forma similar ao observado no grupo eutireoidiano, o que é de suma importância, uma vez que o hipotireoidismo é uma condição sistêmica que afeta o reparo tecidual principalmente a organização e deposição das fibras colágenas.

Já no período de 14 dias, observou-se que todos os grupos, irradiados ou não, apresentaram idênticas quantidades e distribuição das fibras colágenas, independentemente da condição sistêmica associada. Entretanto, os grupos irradiados apresentaram maior grau de maturação colagênica que os não irradiados, e os grupos eutireoidianos demonstraram melhores resultados que os grupos hipotireoidianos, exceto quando a fototerapia LED foi utilizada, pois esta luz promoveu maturação idêntica em ambos os grupos. Neste mesmo período observou-se desaceleração na produção de colágeno nos grupos irradiados, em comparação aos não irradiados. Conforme relatado na literatura, isto se deve ao estágio de maturação do reparo, caracterizado pela redução da proliferação celular, com redução gradual no número e tamanho de fibroblastos (CARVALHO et al., 2006; BUSNARDO e BIONDO-SIMÕES, 2010).

Uma variedade de estudos encontrados na literatura, também tem demonstrado o efeito da luz na deposição e organização das fibras colágenas durante o processo de reparo, acelerando a cicatrização. Pinheiro et al. (2005), compararam o efeito da luz polarizada ($\lambda 400-2000\text{nm}$, $\sim 2\text{ cm}$, 40mW , $20\text{J}/\text{cm}^2$ ou $40\text{J}/\text{cm}^2$) com o Laser vermelho ($\lambda 685\text{ nm}$, $\sim 2\text{ mm}$, 40mW , $20\text{J}/\text{cm}^2$ ou $40\text{J}/\text{cm}^2$) na cicatrização de feridas em ratos e observaram que a dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$, em ambas as fontes de luz, levou a maior deposição colagênica, com conseqüente aceleração no processo de reparo, conforme observado no presente estudo. Medrado et al. (2008), Pugliese et al. (2003) e Reis et al. (2008) avaliaram o efeito da fototerapia Laser ($\lambda 670\text{nm}$) na produção de fibras colágenas durante processo de cicatrização de feridas e observaram maior expressão das fibras colágenas nos grupos submetidos à irradiação com Laser, quando comparados aos não irradiados. Entretanto, estudos com LED ainda estão escassos.

Como as fibras colágenas são importantes no processo de remodelação da ferida, e a literatura não tem demonstrado, especificamente, qual o tipo de colágeno que sofre interferência da deficiência de hormônios tireoidianos, bem como da ação das luzes Laser e LED, o presente estudo optou por avaliar a imunexpressão dessas proteínas durante o processo de reparo, através da utilização de imunomarcadores para o colágeno tipo I e tipo III, uma vez que estes são os principais componentes da matriz extracelular e os responsáveis pela fase de remodelação, essencial para garantir a resistência tecidual.

A qualidade e a quantidade total de fibras colágenas na matriz, bem como sua espessura e distribuição no processo de remodelação e maturação tecidual, são responsáveis por oferecer maior resistência à tensão cicatricial (NATORI et al, 1999; ROCHA, 2004; ZIMMERMANN et al, 2009). Nos estágios iniciais da cicatrização do tecido, as fibras colágenas são delicadas e estão arrançadas frouxamente, sendo representadas predominantemente pelo colágeno III. Por outro lado, em fases posteriores do processo de reparação, as fibras exibem padrão organizacional mais compacto, com feixes mais densos, sendo representados principalmente pelo colágeno do tipo I (MEDRADO et al, 2008; PEREIRA et al, 2010). A maior porcentagem do colágeno I em relação ao colágeno III indica o estado de maturação do colágeno (BUSNARDO e BIONDO-SIMÕES, 2010).

Quanto à caracterização do tipo de colágeno apresentado pelo tecido neoformado, Melo et al. (2011) observaram que nos grupos irradiados com Laser, e avaliados no período de 7 e 14 dias, houve, respectivamente, tendência ao predomínio do colágeno tipo III, ou mistura de colágeno tipo III e I, em iguais proporções, enquanto que no grupo controle predominou o colágeno do tipo I. Já Busnardo e Biondo Simões (2010), observaram que houve maior deposição de colágeno III no grupo irradiado com Laser no 3º dia pós-operatório e que a deposição do colágeno I tendeu a ser maior no grupo irradiado, porém não foi verificada diferença estatística entre os grupos nos três períodos avaliados (3, 7 e 14 dias).

No presente estudo, quando os grupos irradiados foram comparados aos não irradiados, observou-se maior predominância de colágeno I, tanto no período experimental de sete quanto de 14 dias, principalmente quando a luz LED foi utilizada, porém houve diferença estatisticamente significativa apenas quando o grupo HD foi comparado ao HC. Em relação ao colágeno III, sua deposição foi maior nos grupos irradiados com LED, em ambos os períodos, com exceção do grupo hipotireoidiano irradiado com Laser e avaliado em 14 dias. Entretanto, a diferença estatisticamente significativa foi observada apenas no 7º dia, quando o grupo eutireoidiano irradiado com LED foi comparado aos grupos eutireoidianos controle e irradiado com Laser.

Quando o grupo eutireoidiano foi comparado ao hipotireoidiano, observou-se que em ambos os períodos experimentais, o grupo eutireoidiano apresentou maior deposição tanto de colágeno I quanto de colágeno III. Entretanto, houve diferença

estatisticamente significativa, apenas entre os grupos controles não irradiados, avaliados em sete dias, demonstrando que as luzes foram capazes de promover deposição colagênica nos ratos induzidos ao hipotireoidismo de modo similar aos ratos sem disfunção sistêmica associada.

Já na comparação entre os períodos experimentais de sete e 14 dias, observou-se que tanto nos grupos eutireoidianos, quanto nos grupos hipotireoidianos avaliados em 14 dias, a deposição de colágeno I foi maior que a observado em sete dias. A maior porcentagem do colágeno I é de suma importância para o tecido, uma vez que indica que o estado de maturação do colágeno está mais avançado, conforme observado por Busnardo e Biondo Simões (2010). Já em relação ao colágeno tipo III, apenas os grupos irradiados com LED avaliados em 14 dias demonstraram menor predominância na deposição deste colágeno, quando comparado aos avaliados em 7 dias, cuja deposição foi maior nos períodos iniciais do reparo conforme observado na literatura (MEDRADO et al, 2008; PEREIRA et al, 2010). Entretanto, a explicação exata para estes resultados não é completamente compreendido, de modo que as investigações ainda são necessárias para elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos observados neste estudo.

A literatura consultada demonstrou diversos estudos com resultados biomoduladores positivos com a utilização das fototerapias Laser e LED na reparação tecidual. No entanto, ainda há controvérsias nos resultados observados (PUGLIESE et al, 2003; DAMANTE et al, 2004; ROCHA JÚNIOR et al, 2006). Tais discrepâncias podem estar associadas à ampla variedade de modelos experimentais disponíveis, método de avaliação dos resultados, variabilidade dos parâmetros utilizados nos protocolos de irradiação, como as diferenças do comprimento de onda, densidade de energia, potências e irradiancias, tempo e frequência de irradiação, número de sessões, além das condições de tratamento, o que dificulta a comparação entre os estudos (VINCK et al, 2003; BORGIO, 2010).

Também é importante considerar o constante surgimento de diferentes equipamentos e dos novos protocolos de irradiação, que precisam ser avaliados (BORGIO, 2010; PUGLIESE et al, 2003). Como a maioria dos estudos encontrados na literatura é realizada em modelos experimentais saudáveis, sendo limitado, aqueles que associam estas fototerapias ao comprometimento sistêmico, ainda não há definições do melhor protocolo de irradiação a ser instituído, não havendo um consenso quanto à melhor dosagem, potência e tempos de aplicação.

Apesar dos contrastes observados na literatura, a luz LED já é considerada como alternativa à fototerapia Laser para promover a cicatrização de feridas (AL-WATBAN; ANDRES, 2003; WHELAN et al, 2001; WHELAN et al, 2003; VINCK et al, 2003), no entanto, esta terapia ainda é pouco abordada principalmente na área clínica e mais investigações são necessárias para explicar os mecanismos da biomodulação e fornecer orientações suficientes para a utilização de parâmetros mais eficazes para o tratamento com LED em ambientes clínicos. Além disso, o crescente interesse em estudar os efeitos do LED também pode estar associado ao baixo custo desse equipamento em relação ao Laser (AL-WATBAN; ANDRES, 2003; WHELAN et al, 2003; DALL AGNOLL et al, 2009), tornando-o acessível a um maior número de pessoas, o que é de fundamental importância.

Devido ao menor custo dos diodos emissores de luz, é possível incorporar maior quantidade de diodos, o que promove uma área de saída do feixe grande o suficiente para atingir áreas maiores, sendo esta uma característica importante no tratamento de pacientes com lesões e feridas mais extensas. Com isso, o tempo de tratamento dos pacientes acometidos por feridas de grandes dimensões e quadros algícos difusos se torna mais dinâmico (WHELAN et al, 2001).

Diante dos benefícios oferecidos pelas fototerapias, e da necessidade de reparação tecidual em pacientes acometidos por lesões crônicas, o investimento em pesquisa acerca dos recursos terapêuticos disponíveis para acelerar o processo de cicatrização, torna-se cada vez mais necessário, no intuito de permitir que os pacientes acometidos por alguma disfunção sistêmica que interfira no processo de reparo, possam retornar, o mais rápido possível, às suas atividades laborais.

7 CONCLUSÃO

O hipotireoidismo foi capaz de retardar o processo de cicatrização, e as fototerapias Laser (GaAIIAs, $\lambda 660\text{nm}$, 40mW, CW, 0,04cm²) e LED (InGaAIP, $\lambda 630\pm 20\text{nm}$, 150mW, CW, 0,5cm²) ajustadas a 24J/cm² por sessão, foram capazes de melhorar o processo de reparo tecidual nos parâmetros especificados dentro do período de 14 dias, principalmente em relação às variáveis reepitelização, proliferação fibroblástica, distribuição colagênica e imunoeexpressão dos colágenos tipo I e III, quando comparados aos grupos não irradiados, tanto no grupo eutireoidiano quanto no grupo hipotireoidiano.

REFERÊNCIAS

1. AL-WATBAN, F.A. Laser Therapy Converts Diabetic Wound Healing to Normal Healing. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n.1, p.127-135, 2009.
2. AL-WATBAN, F.A.; ANDRES, B.L. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.21, n.5, p.249-258, 2003.
3. BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**. v.31, n.6, p.674-686, 2005.
4. BIONDO-SIMÕES, M.D. et al. Processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento. Estudo da cicatrização de anastomoses intestinais, em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.20, suppl 1, p.113-119, 2005a.
5. BIONDO-SIMÕES, M.D. et al. O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento. Estudo da cicatrização da parede abdominal, em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.20, Suppl1, p.120-128, 2005b.
6. BORGIO, M. Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em tecido cutâneo de ratos submetidos a laser terapêutico. 2010. 183f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010).
7. BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.117, Suppl 7, p.1e-S-32e-S, 2006.
8. BUSNARDO, V.L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 14, n. 1, p. 45-51, 2010.
9. CAETANO, K.S. et al. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.27, n.1, p.:111-118, 2009.
10. CARVALHO, P.T.C. et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, p.177–183, 2006.
11. CORAZZA, A.V. et al. Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.2, p.102–106, 2007.
12. CORAZZA, A.V. Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2005.
13. COTRAN, R.S. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

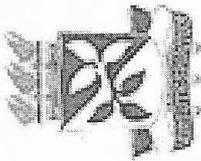
14. DALL AGNOL, M.A. et al. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**. v.24, n.6, p.909-916, 2009.
15. DAMANTE, C.A. et al. Histomorphometric study of the healing of oral mucosa after gingivoplasty and low level laser therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.35, n.5, p.377-384, 2004.
16. DE SOUSA, A.P. et al. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n.4, p.547-552, 2010.
17. DE SOUSA, A.P. et al. Effect of LED phototherapy ($\lambda 700 \pm 20$ nm) on TGF- β expression during wound healing: an immunohistochemical study in a rodent model. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.29, n.9, p.605-11, 2011.
18. DESMET, K.D. et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.24, n.2, p.121-128, 2006.
19. DOUGLAS, N. et al. Influência do Hipotireoidismo Induzido por Propiltiouracil na Mucosa Gengival do Rato. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 50, n. 5, p. 926-929, 2006
20. EKMEKTZOGLOU, K.A.; ZOGRAFOS, G.C. Aconcomitant review of the effects of diabetes melittus and hypothyroidism in wound healing. **World J Gastroenterol**. v.12, n.17, p.2721-2729, 2004.
21. ENWEMEKA, C.S. The place of coherence in light induced tissue repair and pain modulation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.24, n.4, p.457, 2006.
22. FERREIRA, A.S. et al. Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v.12, n.5, p.351-358, 2008.
23. FERREIRA, E. et al. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 5, p.1245-1249, 2007.
24. FORTUNATO, R.S.; ROSENTHAL D.; CARVALHO, D.P. Abuso de Esteróides Anabolizantes e seu Impacto sobre a Função Tireóidea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 51, n. 9, p.1417-1424, 2007.
25. GOMES, M. et al. Apoptose, Proliferação e Histomorfometria do Baço de Ratas Adultas com Hipofunção Tireoidiana e Ovariana. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 52, n. 6, p. 1031-1038, 2008.
26. GOMES, M.G. et al. Apoptose, Proliferação e Histomorfometria do Baço de Ratas Adultas com Hipofunção Tireoidiana e Ovariana. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.52, n.6, p.1031-1038, 2008.
27. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006.
28. HAMBLIN, M.R.; DEMIDOVA, T.N. Mechanisms of Low Level Light Therapy. **Proc Spie**, v 6140, p.1-12, 2006.
29. HODE L. The importance of coherence. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 23, n.4, p.431-234, 2005.

30. HUANG, S.A.; BIANCO, A.C. Reawakened interest in type III iodothyronine deiodinase in critical illness and injury. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**. v. 4, p. 148-155, 2008.
31. ISAAC, C. et al. Processo de cura de feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med**. v.89, n.1/4, p.125-131, 2010.
32. KARU, T. **Low-power laser therapy**. **Biomedical Photonics Handbook**, v. 48, p.1-26, 2003.
33. KUMAR, M.B.B.S.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robins & Cotran **Patologia Humana**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. cap. 4. 2005.
34. LAZAR, M.A. Thyroid hormone action: a binding contract. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, n. 4, p. 497-499, 2003.
35. LEE, H.W. et al. An activator protein- 1 (AP-1) response element on pro alpha (1) collagen gene is necessary for thyroid hormon-induced inhibition for promoter activity in cardiac fibroblasts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 30, n.11, p. 2495-506, 1998.
36. LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**. v. 25, n. 1, p.9-18, 2007.
37. LOW, J.; REED, A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. São Paulo: Manole, p.472.
38. MARCHIONNI, A.M.T. et al. Influence of Laser (λ 670 nm) and Dexamethasone on the Chronology of Cutaneous Repair. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, n.5, p.639-646, 2010.
39. MARTINEZ, B. et al. Hypothyroidism decreases the biogenesis in free mitochondria and neuronal oxygen consumption in the cerebral cortex of developing rats. **Endocrinology**. v. 150, n.8, p. 3953-3959, 2009.
40. MARTINS, B.M.R. et al. Efficacy of new microprocessed phototherapy system with Five high intensity light emitting diodes (Super LED). **Jornal de Pediatria**. v.83, n.3, p.253-257, 2007.
41. MEDRADO, A. et al. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. v.26,, n.4, p.192-197, 2010.
42. MEDRADO, A.P. et al. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v.92, n.3, p.144-52, 2008.
43. MEDRADO, A.R. et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.32, n.3, p.239-244, 2003.
44. MEIRELES, G.C.S. et al. Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.26, p.47-57, 2008.
45. MELO, V.A. et al. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.26, n.2, 2011.

46. MEYER, E.L.; WAGNER, M.S.; MAIA, A.L. Expressão das Iodotironinas Desiodases nas Neoplasias Tireoidianas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 51, n. 5, p. 690-700, 2007.
47. MEYER, P.F. et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**. v.11, n.6, p.428-432, 2010.
48. MILHORANSA, P.; SOARES, R. Hormônio de estimulação da tireóide (TSH) e correlações laboratoriais. **RBAC**. v. 41, n. 2, p. 161-164, 2009.
49. MOOLMAN, J. A. Thyroid hormone and the heat. **Cardiovascular journal of south África**, v. 13, n. 4, 2002.
50. NATORI, J. et al. The influence of hypothyroidism on wound healing. **Journal of Nippon Medical School**. v. 66, n. 3, p. 176-180, 1999.
51. NUNES, M.T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. **Endocrinology And Metabolism**. v. 47, n. 6, p. 639-643, 2003.
52. PELOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n.3, p.291-325, 2010.
53. PEREIRA, M.C.M.C. et al. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v.98, n.3, p.188-192, 2010.
54. PINHEIRO, A.L. et al. Biomodulative effects of visible and IR laser light on the healing of cutaneous wounds of nourished and undernourished Wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.27, n.6, p.947-957, 2009.
55. PINHEIRO, A.L.B. Advances and Perspectives on Tissue Repair and Healing. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 6, p. 833-836, 2009.
56. PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA-JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.
57. PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, n.5, p.616-24, 2006.
58. PINHEIRO, A.L.B. et al. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished Wistar rats. **Brazilian Dental Journal**. v. 15 (special issue), p. SI21-SI28, 2004.
59. PINHEIRO, A.L.B. et al. Polarized light (400-2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 23, n.5, p.485-92, 2005.
60. PONTES, A.A.N. et al. Prevalência de Doenças da Tireóide em Uma Comunidade do Nordeste Brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.46, n.5, p.544-549, 2002.
61. PUGLIESE, L.S. et al. The influence of low level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v.17, n..2, p.307-3013, 2003.

62. RABELO, S.B. et al. Comparison between Wound Healing in Induced Diabetic and Nondiabetic Rats after Low-Level Laser Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.24, n.4, p. 474–479, 2006.
63. RAITZ, R. Extracellular matrix role on the wound healing of oral lesions. **Journal of the Health Sciences Institute**; v.26, n.3, p.351-356, 2008.
64. RAMALHO, L.M.P, et al. . Assessment of laser photobiomodulation and polarized light on the healing of cutaneous wounds on euthyroid and hypothyroid induced rats. **Proc. of SPIE**, 7552 75520P1, 2010.
65. REIS, S.R. et al. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.26, n.4, p.307-13, 2008.
66. RIBEIRO, M. A. et al. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660nm. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.
67. ROCHA JUNIOR, A.M. et al. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. **Clinical, Epidemiological, Laboratory and Therapeutic Investigation**. v.81, n.2, p.150–156, 2006.
68. ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. **RBPS** , v.17, n.1, p.44-48, 2004.
69. RODRIGUES, S.S.F.G. et al. Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos, no reparo de feridas cutâneas em ratos. **ClípeOdonto - Unitau**. v.1, n.1, p.31-37, 2009.
70. RODRIGUEZ, T.T.; DANTAS, V.T.A.; RAMALHO, M.J.P. Participation of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the salivary secretion of hypothyroid endotoxemic rats. **Revista odonto ciência**. v. 24, n. 4, p. 383-388, 2009.
71. SAFER, J.D., CRAWFORD, T.M., HOLICK, M.F. A role for thyroid hormone in wound healing through keratin gene expression. **Endocrinology**. v.145, n.5, p. 2357–2361, 2004.
72. SAFER, J.D.; CRAWFORD, T.M.; HOLICK, M.F. Topical thyroid hormone accelerates wound healing in mice. **Endocrinology**. v. 146, p. 4425–4430, 2005.
73. SANDOVAL, R.L. et al. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy laser: initial results of a.c. camargo hospital. **Journal of Applied Oral Science**. v. 11, n.4, p.337-341, 2003.
74. SANTOS, N.R.S. et al. Influence of the Use of Laser Phototherapy (l660 or 790 nm) on the Survival of Cutaneous Flaps on Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n.4., p. 483–488, 2010.
75. SETHI, K.K. et al. Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast–mediated collagen contraction. **Wound Repair and Regeneration**. v.10, n.6, p.397-408, 2002.
76. SOMMER, A.P. et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.19, n.1, p.29-33, 2001.

77. STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. Barueri: Manole, p.404, 2001.
78. TOHEI, A. Studies on the functional relationship between thyreoid, adrenal and gonadal hormones. **Journal of reproduction and development**. v. 50, n. 1, 2004.
79. TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser Therapy: Clinical Praticce and Scientific Background**. Sweden: Prima Books, 2002.
80. VIEGAS, V.N. et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.6, p.467-473, 2007.
81. VINCK, E.M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**. v.18, n.2, p.95-99, 2003.
82. VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.
83. WALSH, L.J. The current status of laser applications in dentistry. **Australian Dental Journal**. v.48, n.3, p.146-155, 2003.
84. WEISS, R.A. et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. **Dermatologic Surgery**. v.31, n. 9, p.1199-1205, 2005.
85. WHELAN, H.T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.21, n.2, p.67-74, 2003.
86. WHELAN, H.T. et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.20, n.6, p.319–324, 2002.
87. WHELAN, H.T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.19, n.6, p.305–314, 2001.
88. WINYARD, P.G.; WILLOUGHBY, D.A. **Inflamation protocols**. Humana Press; 2003.
89. WOLLMANN, D.E.; NICOLAU, R.A. Dentin Hypersensitivity Treatment the Terapy with LED. Clinical Study. **Conscientiae Saúde**. v. 8, n.4, p.575-580, 2009.
90. YAO, J.; EGHBALI, M. Decreased collagen mRNA and regression of cardiac fibrosis in the ventricular myocardium of the tight skin mouse following thyroid hormone treatment. **Cardiovascular Research**. v. 26, p. 603-607, 1992.
91. ZCHARIA, E. et al. Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models. **FASEB Journal**. v.19, n.2, p. 211-212, 2005.
92. ZIMMERMANN, E. et al. Tracheal suture in rats with hypothyroidism. Wound healing study. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 24, n. 4, p. 282-289, 2009.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Canela
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966
Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa “AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA AÇÃO DO LASER NÃO ABLATIVO DE 680 NM NO REPARO DE FERIDAS SUBCUTÂNEAS CONFECCIONADAS NO DORSO DE RATOS HIPOTIREOIDIANOS. - 16/09” de autoria de LUCIANA M^a PEDREIRA RAMALHO, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 20 de outubro de 2009

Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro
Presidente
Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro, PhD
Mat. 1749908
Presidente - CEEA

ANEXO B

Tabela 2: Resultados da análise histológica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).

CRITÉRIO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Eutireoidiano Controle	Eutireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Eutireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Reepitelização	Ausente	0	0	0
	Recobrimento menor que a metade da ferida	0	33,3	0
	Recobrimento maior que a metade da ferida	0	0	33,3
	Recobrimento completo da ferida com espessura irregular	83,3	16,7	0
	Recobrimento completo da ferida com espessura regular	16,7	50	66,7
Inflamação Aguda	Ausente	0	0	0
	Discreta	100	83,3	66,7
	Moderada	0	16,7	33,3
	Intensa	0	0	0
Inflamação Crônica	Ausente	0	0	0
	Discreta	0	66,7	16,7
	Moderada	83,3	33,3	83,3
	Intensa	16,7	0	0
Tecido de granulação	Ausente	0	0	0
	Discreto	0	0	16,7
	Moderado	100	50	66,6
	Intenso	0	50	16,7
Angiogênese	Ausente	0	0	0
	Discreta	0	0	0
	Moderada	0	16,7	50
	Intensa	100	83,3	50
Fibroblastos	Discreto	0	0	0
	Moderado	50	16,7	0
	Intenso	50	83,3	100
Maturação de fibras colágenas	Discreta	16,7	0	16,7
	Moderada	83,3	50	66,6
	Intensa	0	50	16,7
Quantidade de fibras colágenas	Discreta	0	0	0
	Moderada	100	50	83,3
	Intensa	0	50	16,7
Distribuição de fibras colágenas	Irregular	16,7	0	0
	Regular	83,3	100	100

Tabela 3: Resultados da análise histológica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).

CRITÉRIO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Hipotireoidiano Controle	Hipotireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Hipotireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Reepitelização	Ausente	0	0	0
	Recobrimento menor que a metade da ferida	0	0	16,7
	Recobrimento maior que a metade da ferida	100	40	16,7
	Recobrimento completo da ferida com espessura irregular	0	0	33,3
	Recobrimento completo da ferida com espessura regular	0	60	33,3
Inflamação Aguda	Ausente	0	0	0
	Discreta	80	100	50
	Moderada	20	0	50
	Intensa	0	0	0
Inflamação Crônica	Ausente	0	0	0
	Discreta	0	0	16,7
	Moderada	40	60	50
	Intensa	60	40	33,3
Tecido de granulação	Ausente	0	0	0
	Discreto	0	40	0
	Moderado	40	60	83,3
	Intenso	60	0	16,7
Angiogênese	Ausente	0	0	0
	Discreta	0	0	0
	Moderada	20	40	50
	Intensa	80	60	50
Fibroblastos	Discreto	0	0	0
	Moderado	100	80	83,3
	Intenso	0	20	16,7
Maturação de fibras colágenas	Discreta	20	40	0
	Moderada	80	60	66,7
	Intensa	0	0	33,3
Quantidade de fibras colágenas	Discreta	0	40	0
	Moderada	100	60	66,7
	Intensa	0	0	33,3
Distribuição de fibras colágenas	Irregular	100	40	50
	Regular	0	60	50

Tabela 4: Resultados da análise histológica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).

CRITÉRIO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Eutireoidiano Controle	Eutireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Eutireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Reepitelização	Ausente	0	0	0
	Recobrimento menor que a metade da ferida	0	0	0
	Recobrimento maior que a metade da ferida	0	0	0
	Recobrimento completo da ferida com espessura irregular	0	0	0
	Recobrimento completo da ferida com espessura regular	100	100	100
Inflamação Aguda	Ausente	100	83,3	100
	Discreta	0	16,7	0
	Moderada	0	0	0
	Intensa	0	0	0
Inflamação Crônica	Ausente	16,7	50	60
	Discreta	83,3	33,3	40
	Moderada	0	16,7	0
	Intensa	0	0	0
Tecido de granulação	Ausente	16,7	66,6	80
	Discreto	83,3	16,7	20
	Moderado	0	16,7	0
	Intenso	0	0	0
Angiogênese	Ausente	16,7	0	0
	Discreta	16,7	66,7	100
	Moderada	50	33,3	0
	Intensa	16,7	0	0
Fibroblastos	Discreto	0	0	0
	Moderado	66,7	83,3	0
	Intenso	33,3	16,7	100
Maturação de fibras colágenas	Discreta	0	0	0
	Moderada	66,7	0	0
	Intensa	33,3	100	100
Quantidade de fibras colágenas	Discreta	0	0	0
	Moderada	0	0	0
	Intensa	100	100	100
Distribuição de fibras colágenas	Irregular	0	0	0
	Regular	100	100	100

Tabela 5: Resultados da análise histológica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).

CRITÉRIO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Hipotireoidiano Controle	Hipotireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Hipotireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Reepitelização	Ausente	0	0	0
	Recobrimento menor que a metade da ferida	0	0	0
	Recobrimento maior que a metade da ferida	0	0	0
	Recobrimento completo da ferida com espessura irregular	0	0	0
	Recobrimento completo da ferida com espessura regular	100	100	100
Inflamação Aguda	Ausente	80	83,3	100
	Discreta	0	16,7	0
	Moderada	20	0	0
	Intensa	0	0	0
Inflamação Crônica	Ausente	0	33,3	0
	Discreta	80	66,7	75
	Moderada	20	0	25
	Intensa	0	0	0
Tecido de granulação	Ausente	0	33,3	25
	Discreto	40	66,7	50
	Moderado	60	0	0
	Intenso	0	0	25
Angiogênese	Ausente	0	0	0
	Discreta	0	66,7	50
	Moderada	100	33,3	50
	Intensa	0	0	0
Fibroblastos	Discreto	0	33,3	25
	Moderado	100	50	50
	Intenso	0	16,7	25
Maturação de fibras colágenas	Discreta	0	0	0
	Moderada	40	33,3	0
	Intensa	60	66,7	100
Quantidade de fibras colágenas	Discreta	0	0	0
	Moderada	0	0	0
	Intensa	100	100	100
Distribuição de fibras colágenas	Irregular	0	0	0
	Regular	100	100	100

Tabela 6: Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).

ANTICORPO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Eutireoidiano Controle	Eutireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Eutireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Anti Colágeno I	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	100	60	60
	Moderada (++)	0	40	40
	Intensa (+++)	0	0	0
Anti Colágeno III	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	33,3	100	0
	Moderada (++)	66,7	0	33,3
	Intensa (+++)	0	0	66,7

Tabela 7: Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 7 dias (UFBA, 2012).

ANTICORPO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Hipotireoidiano Controle	Hipotireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Hipotireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Anti Colágeno I	Ausente (-)	80	40	0
	Discreta (+)	20	60	80
	Moderada (++)	0	0	20
	Intensa (+++)	0	0	0
Anti Colágeno III	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	50	16,7	0
	Moderada (++)	33,3	83,3	50
	Intensa (+++)	16,7	0	50

Tabela 8: Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Eutireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).

ANTICORPO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Eutireoidiano Controle	Eutireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Eutireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Anti Colágeno I	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	33,3	16,7	16,7
	Moderada (++)	66,7	50	33,3
	Intensa (+++)	0	33,3	50
Anti Colágeno III	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	16,7	0	0
	Moderada (++)	50	66,7	50
	Intensa (+++)	33,3	33,3	50

Tabela 9: Resultados da análise imuno-histoquímica dos grupos Hipotireoidianos Controle, Laser ($\lambda 660\text{nm}$) e LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$) avaliados no período experimental de 14 dias (UFBA, 2012).

ANTICORPO	CLASSIFICAÇÃO	PERCENTUAL DA AMOSTRA (%)		
		Hipotireoidiano Controle	Hipotireoidiano Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	Hipotireoidiano LED ($\lambda 630\pm 20\text{nm}$)
Anti Colágeno I	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	66,7	50	33,3
	Moderada (++)	33,3	50	66,7
	Intensa (+++)	0	0	0
Anti Colágeno III	Ausente (-)	0	0	0
	Discreta (+)	0	16,7	0
	Moderada (++)	83,3	50	100
	Intensa (+++)	16,7	33,3	0